

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-506613

(P2002-506613A)

(43) 公表日 平成14年3月5日(2002.3.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/00	Z N A	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 7/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 7/00		17/00	4 C 0 8 4
17/00		19/00	
19/00		25/00	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 60 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-530630(P2000-530630)
 (86) (22) 出願日 平成11年2月4日(1999.2.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年8月7日(2000.8.7)
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 9 / 0 0 6 6 4
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 4 0 2 2 0
 (87) 国際公開日 平成11年8月12日(1999.8.12)
 (31) 優先権主張番号 9 8 0 2 4 7 5 . 5
 (32) 優先日 平成10年2月6日(1998.2.6)
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 グラクソ グループ リミテッド
 GLAXO GROUP LIMITED
 イギリス ミドルセックス ユービー6
 0 エヌエヌ グリーンフォード パークレ
 ー アベニュー グラクソ ウェルカム
 ハウス (番地なし)
 (72) 発明者 ゴーシェ、ジャン-ミシェル
 フランス国、エフ - 91940 レ・ユリ、
 アブニュ・ドゥ・ケベック 25、ゼッド・
 アー・ドゥ・クールタプフ、サントル・ド
 ウ・ルシュルシュ、ラボラトワール・グラ
 クソ・ウェルカム内
 (74) 代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外4名)
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療剤をスクリーニングする方法

(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】 本発明は、一以上の S m a d および T G F β 又はアクチビンによる遺伝子制御に関連する疾病との関病において使用するための治療剤をスクリーニングする方法であって：前記薬剤の存在下において、S m a d タンパク質又はそのDNA結合性断片と、配列 5' W X Y C A G A C Z 3' 又はその機能的均等物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドとの間の転写活性又は結合の程度又は結果を検出又はアッセイすることを包含する方法に関する。前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A、G又はTを表し、ZはA又はCを表す。このような方法によって同定された治療剤、S m a d に媒介される T G F β 誘導性遺伝子の異常な発現に関連した疾病と関病する上でのそれらの使用も請求の範囲に属する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一以上のSmadタンパク質及びTGF β 又はアクチビンによる遺伝子制御に関連する疾病との関病において使用するための治療剤をスクリーニングする方法であって、

前記治療剤の存在下において、Smadタンパク質又はそのDNA結合性断片と、配列5' WXYCAGACZ3' 又はその機能的均等物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドとの間の転写活性又は結合の程度又は結果を検出又はアッセイすることを備えた方法（ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A、G又はTを表し、ZはA又はCを表す）。

【請求項2】 前記二本鎖オリゴヌクレオチドが、配列5' WXYCAGACZ3' 又はその機能的均等物を含む請求項1に記載の方法（ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A又はTを表し、ZはA又はCを表す）。

【請求項3】 前記二本鎖オリゴヌクレオチドが、配列5' AG（C/A）CAGACA3'、又はその機能的均等物を含む請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 前記二本鎖オリゴヌクレオチドが、配列5' ATGCAGACA3'、又は5' GGCCAGACA3' 又はその機能的均等物を含む請求項1又は2に記載の方法。

【請求項5】 繊維症疾患、異常創傷治癒、異常骨形成、癌発生、造血疾患、神経保護疾患、並びに免疫および炎症性疾患の治療に使用するための請求項1～3の何れか1項に記載の方法。

【請求項6】 一以上のSmadタンパク質及びTGF β 又はアクチビンによる遺伝子制御に関連する疾病と関病するのに適した物質をスクリーニングするためのキットであって、

一本明細書に記載されているSmadタンパク質

一TGF β 又はアクチビン

一前記配列5' WXYCAGACZ3' 又はその機能的均等物を含む二本鎖DNA分子であって、前記配列は、必要に応じて、プロモーター又はエンハン

サー配列及びその産物が検出可能である遺伝子のコード領域とに作用可能に連結されている二本鎖DNA分子（ここで、前記ヌクレオチド配列において

WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A又はGを表し、ZはA又はCを表す）

を備えたキット。

【請求項7】 ー以上のSmadタンパク質及びTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御に関連した疾病を治療する方法であって、ヒトを含む哺乳類に、前記配列5‘WXYCAGACZ3’又はその機能的均等物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドを投与することを備えた方法（ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A又はGを表し、ZはA又はCを表す）。

【請求項8】 ー以上のSmadタンパク質及びTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御に関連する疾病の治療における、前記配列5‘WXYCAGACZ3’又はその機能的均等物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドの使用（ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A又はGを表し、ZはA又はCを表す）。

【請求項9】 ー以上のSmadタンパク質及びTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御に関連する疾病を治療するための医薬を製造する上での、前記配列5‘WXYCAGACZ3’又はその機能的均等物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドの使用（ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A又はGを表し、ZはA又はCを表す）。

【請求項10】 ー以上のSmadタンパク質及びTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御に関連した疾病を治療する方法であって、ヒトを含む哺乳類に、前記Smadタンパク質の転写活性又は前記Smadタンパク質のTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御に関与するプロモーター又はエンハンサーとの結合を阻害し、又は活性化する物質を治療的量投与することを備え、前記プロモーター又はエンハンサーがヌクレオチド配列5‘WXYCAGACZ3’又はその機能的均等物を含む方法（ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又は

Gを表し、XはG又はTを表し、YはC、A又はGを表し、ZはA又はCを表す)。

【請求項11】 一以上のSmadタンパク質及びTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御と関連する疾病の治療における、治療量の、一以上のSmadタンパク質の転写活性又は一以上のSmadタンパク質のTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御に関与するプロモーター又はエンハンサーとの結合を阻害し、又は活性化する物質の使用であって、前記プロモーター又はエンハンサーがヌクレオチド配列5'WXYCAGACZ3'又はその機能的均等物を含む使用(ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A又はGを表し、ZはA又はCを表す)。

【請求項12】 一以上のSmadタンパク質及びTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御と関連する疾病を治療するための医薬の製造における、治療量の、一以上のSmadタンパク質の転写活性又は一以上のSmadタンパク質のTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御に関与するプロモーター又はエンハンサーとの結合を阻害し、又は活性化する物質の使用であって、前記プロモーター又はエンハンサーがヌクレオチド配列5'WXYCAGACZ3'又はその機能的均等物を含む使用(ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A又はGを表し、ZはA又はCを表す)。

【請求項13】 一以上のSmadタンパク質及びTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御と関連する疾病を治療する方法であって、治療量の請求項1～4の何れか1項に記載の方法で同定された物質を、ヒトを含む哺乳類に投与することを備えた方法。

【請求項14】 一以上のSmadタンパク質及びTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御と関連する疾病の治療における、治療量の請求項1～4の何れか1項に記載の方法で同定された物質の使用。

【請求項15】 一以上のSmadタンパク質及びTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御に伴う疾病を治療するための医薬の製造における、治療量の請求項1～4の何れか1項に記載の方法で同定された物質の使用。

【請求項16】 配列5' WXYCAGACZ3' 又はその機能的均等物を含む単離された二本鎖DNA分子（ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A、G又はTを表し、ZはA又はCを表す）。

【請求項17】 配列5' AG (C/A) CAGACA3' を有する請求項16に記載の単離された二本鎖DNA分子。

【請求項18】 配列5' ATGCAGACA3' を有する請求項16に記載の単離された二本鎖DNA分子。

【請求項19】 配列5' GGCCAGACA3' を有する請求項16に記載の単離された二本鎖DNA分子。

【請求項20】 一以上のSmadタンパク質の転写活性又はTGFβ又はアクチビンによる遺伝子制御に関与するプロモーター又はエンハンサーとの一以上のSmadタンパク質の結合を阻害し、又は活性化する治療剤であって、前記プロモーター又はエンハンサーがヌクレオチド配列5' WXYCAGACZ3' 又はその機能的均等物を含む治療剤（ここで、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A、G又はTを表し、ZはA又はCを表す）。

【請求項21】 請求項1～4の何れか1項に記載の方法で同定された治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明はヌクレオチド配列に関し、特に、TGF β およびアクチビン誘導を与え且つSmadタンパク質に結合する転写調節配列と、例えば、Smad媒介性被TGF β 誘導遺伝子の異常発現に関連した疾患との闘病のために有用な薬剤のスクリーニングにおける、該配列の使用に関する。

【0002】

トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF β) は、アクチビンおよび骨誘導タンパク質を含むサイトカイン類のファミリーに属し、これらは多くの細胞タイプによって合成され、増殖、分化、移動、免疫の制御並びに細胞外マトリックスのターンオーバーの調節を含む種々の細胞的および生物学的効果を有する。これら効果の多くにおいて、TGF β -1に例示されるTGF β は、転写アクチベータとして作用する。プラスミノージェンアクチベータインヒビター1型 (PAI-1)、 α 2(I) プロコラーゲン、TGF β -1自身、生殖株Ig α 定常領域、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビターp21およびp15を含む幾つかのプロモータは、TGF β により誘導されることが知られている。

【0003】

Smadファミリーのタンパク質のメンバーは、完全には解明されていない機構を介したTGF β およびアクチビン転写活性化の媒介において、極めて重要な役割を果たす。ショウジョウバエMADオルソログスタンパク質のアミノ末端部分は、転写調節に重要なvestigial遺伝子のエンハンサーに結合することが示されている (Kim et al., Nature, 1997, 388, 304-308)。ツメガエルSmad2およびSmad4タンパク質は、FAST-1転写因子をも含むアクチビン-応答因子 (ARF) と称するタンパク質複合体の成分である。アクチビンに誘導されたツメガエルMix2プロモーターに結合するARFの能力はFAST-1によって与えられ、Smad2/Smad4はコアクチベータとして作用することが提案されている (Chen et al., Nature, 1996, 383, 691-696; Chen et al., Nature, 1997, 389, 85-

89)。TGF β 信号伝達に関与するこれらのSmadタンパク質のうち、Smad6と7はTGF β 信号伝達のインヒビターとして作用することが知られており、Smad2と3はTGF β 信号伝達経路を媒介することが知られており、またSmad4は少なくともSmad2および3とヘテロオリゴマー (heterooligomer) を形成することが知られている (Heldin et al., Nature, 1997, 390, 465-471)。Smad4は、人工構築物のDNA配列に結合することが示されているが、この結合活性はTGF β 依存性の転写活性化を与えない (Yingling et al., Mol. Cell. Biol., 1997, 17, 7019-7028)。

【0004】

我々は今回、二つのSmadタンパク質 (Smad3とSmad4) とDNAとを含む複合体の存在を示し、またSmad3、Smad4はDNA結合性タンパク質であることを示した。また、我々はエキソン3の中にスプライスされたSmad2がDNA結合性タンパク質であることを示した。更に、我々はTGF β 反応性プロモータ内のSmad3/4結合性配列を同定し、Smad3/4の結合がTGF β 誘導性転写効果に必須であることを示した。

【0005】

繊維症疾患、異常創傷治癒、異常骨形成、癌発生、造血疾患、神経保護疾患、並びに免疫および炎症性疾患を含む多くの疾患状態が、TGF β により制御される遺伝子の発現変化に関連することが知られている。PAI-1遺伝子は、TGF β によって活性化される遺伝子の一つであり、最もよく研究されている。PAI-1タンパク質は、内皮細胞、繊維芽細胞、上皮細胞および肝実質細胞を含む幾つかの細胞タイプによって産生される。それは、各々プラスミノゲンからのプラスミンの形成を触媒するウロキナーゼ (UPA) および組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) に対するその阻害作用によって、セリンプロテアーゼプラスミンの活性を間接的に制御する。

【0006】

プラスミンは、マトリックス成分を消化することによって直接的に、また潜在

的形態のマトリックス分解酵素を活性化する能力によって間接的に、細胞外マトリックスの形成および維持に重要な役割を果たす。プラスミンの主要な役割は、フィブリン凝集塊を除去することにある。従って、プラスミンは血管系（即ちフィブリン）およびマトリックスに対して二重の特異性を有する。プラスミンのレベルはPAI-1によって制御されるので、PAI-1はフィブリン分解バランスに対する影響および繊維症病巣の量の制御において重要な役割を有する。マトリックス沈着を制御する能力は、創傷治癒、過形成性瘢痕、ケロイド、硬化性クレルマ（scleroderma）、肝および胆管繊維症、肺繊維症、腎繊維症、心臓繊維症および術後癒着を含む多くの適応症において治療的に重要である（Franklin, Int. J. Biochem. Cell Biol., 1997, 29, 78-89）。現在のところ、繊維症のための治療は存在しない。

【0007】

エキソン3の中にスプライスされたSmad3、Smad4およびSmad2が、PAI-1のようなTGF β 活性化されたプロモーターに結合するDNA結合性タンパク質であるという我々の発見は、エキソン3の中にスプライスされたSmad3、Smad4又はSmad2の、その認識配列に対する結合性又は転写活性を調節することによるSmad媒介性TGF β 遺伝子制御に関連する疾病と闘うための新たなストラテジーを開発するための道を拓き、またSmadを含む複合体（即ち、エキソン3の中にスプライスされたSmad3、Smad4およびSmad2）がその認識配列に結合する程度、又はこうして影響された遺伝子のプロモータにおけるその認識配列に結合したSmadを含む複合体（即ち、エキソン3の中にスプライスされたSmad3、Smad4およびSmad2）の転写能力に影響を及ぼすことによる治療に使用するための、TGF β に調節された遺伝子の発現を調節することができる薬剤をスクリーニングする方法への道を拓く。

【0008】

従って、一つの側面に従えば、本発明はSmadおよびTGF β 又はアクチビンによる遺伝子制御に関連する疾病との闘病において使用するための薬剤をスク

リーニングする方法であって：前記薬剤の存在下において、Sma dタンパク質又はそのDNA結合性断片と、配列5' WXYCAGACZ 3' 又はその機能的均等物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドとの間の転写活性又は結合の程度又は結果を検出又はアッセイすることを包含する方法を提供する。なお、前記ヌクレオチド配列において、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A、G又はTを表し、ZはA又はCを表す。

【0009】

我々は、この配列をCAGAボックスと命名した。ここで使用するCAGAボックスの用語は、我々がPAI-1プロモーターにおいて同定した配列だけでなく、このような配列と機能的に均等な如何なる配列、即ち、個別的又はSma dタンパク質の複合体の一部としてSma dタンパク質に結合できる如何なるヌクレオチド配列をも意味するように使用される。かかる結合は、このような機能的に均等な配列の制御下にある遺伝子のTGF β およびアクチビン調節のために必要なステップである。

【0010】

ここで使用する「スクリーニング」の用語は、Sma dタンパク質とCAGAボックスとの間の結合を調節し、これに影響を与え、影響を及ぼし、又は妨害することができる薬剤の作用、又はCAGAボックスに結合したSma dタンパク質の転写能力を調査する如何なる方法又は試験をも含むものであり、単一の薬剤又は化合物を調査する結合試験ならびに一連の化合物又は化合物のライブラリーのような二以上の化合物をテストする試験を含む。二以上の薬剤をテストする場合、これらのテストは同時に又は順次に行われ得る。このような薬剤は、エキソン3の中にスプライスされたSma d 3、Sma d 4又はSma d 2のようなSma dタンパク質のCAGAボックス配列への結合を阻害する（即ち、CAGAボックスへのSma dの結合を全体的に又は部分的に妨害する）か、又はSma dタンパク質とCAGAボックスとの間の結合を向上させ得るように作用し得る。また、このような薬剤は、エキソン3の中にスプライスされたSma d 3、Sma d 4又はSma d 2のようなCAGAボックス配列に結合したSma dタンパク質の転写活性を調節するように作用し得る。即ち、CAGAボックスに結合

したSma d含有複合体の転写活性を低下するか、又はCAGAボックスに結合したSma d含有複合体の転写活性を高めることができる。この検出又はアッセイ方法は、何等かの結合活性又は転写活性が存在するかどうか、および被検薬剤の効果についての如何なる定量的、定性的又は半定量的試験を含むものである。好ましくは、エキソン3中にスプライスされたSma d 3/Sma d 4/Sma d 2/TGF β /アクチビン調節に関連する疾病との関病において治療的に有用な薬剤をスクリーニングするために、それは、エキソン3中にスプライスされたSma d 3/Sma d 4/Sma d 2/DNA複合体の形成又は当該スクリーニング試験により調査される転写活性に対する調節効果を有する化合物である。

【0011】

ここで使用される「Sma dタンパク質」の用語は、単独で又はタンパク質複合体としてエキソン3の中にスプライスされたSma d 3/Sma d 4/Sma d 2のようなその受容体配列（CAGAボックス）に結合するSma dタンパク質の結合特性をもったタンパク質又はタンパク質複合体を意味し、これらタンパク質のDNA結合性断片、これらタンパク質および修飾を含む融合タンパク質、並びにエキソン3の中にスプライスされたSma d 3、Sma d 4およびSma d 2タンパク質自身を含む。

【0012】

好ましい側面において、当該二本鎖オリゴヌクレオチドは配列AG（C/A）CAGACAを含み、これは我々がPAI-1プロモータにおいて同定した配列である。我々は、TGF β 転写誘導を媒介することが知られている領域におけるヒトPAI-1プロモータ中の三つのコピーに存在する配列AG（C/A）CAGACAを同定した。この配列、およびCAGAモチーフを含むこの配列に極めて類似した配列が、 $\alpha 2$ （1）プロコラーゲン、生殖株Ig α 定常領域およびTGF β 1プロモータを含む、TGF β により誘導され得ることが知られた他のプロモータおよびエンハンサーにおいても同定された。これらの配列は表1に示されており、CAGAボックスの語に含められる。

【表1】

プロモーター	配 列	位 置
ヒトPAI-1プロモーター	AGCCAGACA	-730
	AGACAGACA	-580
	AGACAGACA	-280
ヒトTGFB β -1遺伝子	AGCCAGACA	+22
ヒト α 2(I)コラーゲンプロモーター	ATGCAGACA	-264
ヒト生殖株IG α 定常領域	AGCCAGACC	-120
	GGCCAGACA	-35

【0013】

一つの側面において、本発明のスクリーニング試験に使用するためのオリゴヌクレオチドは、CAGAボックス自身を含んでいる。しかし、このCAGAボックスは一端又は両端にフランキング配列を含み得る。このような配列は、例えば3ヌクレオチドから合計12ヌクレオチド（一端に3ヌクレオチド、もしくは一端に2ヌクレオチド、および他端に1ヌクレオチド）長だけ、CAGAボックスの一方の鎖の長さを伸ばしてもよく、或いは、それらは6ヌクレオチドから合計15ヌクレオチドだけ配列を伸ばしてもよく（追加の塩基は一端にあるか、又はCAGAボックス自身の各末端の間で分割される）、或いは、フランキング配列はCAGAボックスの一方の鎖を更に、例えば合計20ヌクレオチド以上（例えば30、40、又は50ヌクレオチドまで）伸ばしてもよい。本発明における使用のために、当該オリゴヌクレオチドはCAGAボックス自身、又は10ヌクレオチド以下、好ましくは20ヌクレオチド以下、より好ましくは50ヌクレオチド以下だけ延長されたCAGAボックスを含むことができる。必要に応じてフランキング領域を伴ってもよいこのCAGAボックスは、本発明における使用のためのオリゴヌクレオチド中で、例えば50回以下、好ましくは20回以下（例えば10回）だけ反復してもよい。ここで用いる「オリゴヌクレオチド」の用語は、CAGAボックスおよびCAGAボックスに基づくこれら全てのオリゴヌクレオチドを含むものである。好ましくは、このような配列はAP-1結合部位とは明瞭に区別される。

【0014】

好ましい側面において、YはC、A又はGを表す。

【0015】

本発明の方法において使用するために、被検オリゴヌクレオチドは化学的に合成されてもよく、ゲノム断片又はcDNA断片であってもよく、又は組換えベクター、例えばプラスミドもしくはバクテリオファージに基づく組換えベクターの中に組込まれてもよい。

【0016】

一つの側面において、本発明は、被検物質の存在下におけるSmadタンパク質と被検オリゴヌクレオチドとの間の結合、又は被検オリゴヌクレオチドに結合したSmad含有タンパク質複合体の転写活性を、被検物質の不存在下でのそれと比較することを含む。

【0017】

我々は、このTGFβ誘導性CAGAボックスが、Smadに媒介されたTGFβ誘導に特異的に関与することを示した。従って、TKプロモータの上流の多重コピーの中にクローニングすると、CAGAボックス配列はHepG2細胞中においてTGFβ媒介性の転写誘導を与えるが、この配列の変異バージョンであるAGCTACATA、即ち、三つの点突然変異を含む配列はTGFβ誘導を与えないことが見出された。我々は、Smad4を欠失した乳癌由来のヒト上皮細胞であるMDA-MB468細胞におけるTGFβ媒介性の誘導ではSmad4が不可欠であることを示した。ここで、TGFβはCAGAレポータ構築物の発現に対する効果はないが、この細胞株にSmad4をコードする発現構築物を共トランスフェクトすると、TGFβによる誘導が観察された。我々は、TGFβおよび異なるSmadタンパク質の存在下において、HepG2核抽出物の電気泳動の移動性シフト試験(EMSA)を使用することによりCAGA配列の結合特性を立証し、TGFβ依存性CAGAボックス結合性複合体にSmad3およびSmad4が存在することを示した。また、E. coliで発現したSmadタンパク質の存在下でEMSAを用いることにより、我々は、Smad3とSmad4は直接かつ特異的なDNA結合活性を有することを立証した。更に、我々は、密接に関連したSmad2タンパク質はCAGA媒介性の転写を活性化できないことを示した。我々は、Smad2遺伝子中のエキソン3によってコードされるドメインはSmad2がCAGA配列に結合するのを妨げること、および

エキソン3に対応するドメインが存在しないSmad2のバージョンは、CAGAボックスに結合することができ、CAGAボックスからの転写を活性化し得ることを立証した。

【0018】

我々のCAGAボックスに類似した配列が、 $\alpha 2(1)$ プロコラーゲン遺伝子、生殖株Igal $\alpha 2$ 構築領域遺伝子およびTGF $\beta 1$ プロモータのような、TGF β によって調節されるプロモーターの他のTGF β 誘導性領域において同定された。これらの配列は、表1に提示されている。

【0019】

CAGAボックス含有配列又は機能的に均等な配列に対する、一以上の単独又は複合体中のSmadタンパク質の転写能力又は結合性を調節するための潜在的に有用な薬理学的物質をスクリーニングする方法、並びにSmad-TGF β 誘導によって制御される遺伝子の発現を最終的に修飾する方法は、種々の直接的又は間接的方法で実施することができる。

【0020】

直接的なタイプの方法においては、タンパク質（即ち、Smad又はそのCAGA結合性断片）と被検オリゴヌクレオチド又はCAGA含有ヌクレオチド配列との間の結合性複合体の形成が分析される。このために、例えば、細胞から、あるいは大腸菌のような細菌を用いた原核細胞系発現システム、又は酵母若しくはバキュロウイルスのような新各細胞系発現システム、又は例えば網状赤血球溶解液に基づいたインビトロ発現システム等のインビトロ発現システムを含む当該技術分野において公知の発現システムから精製され得るエキソン3の中にスプライスされた哺乳類Smad3、及びSmad4若しくはSmad2タンパク質、又はそのCAGAボックス結合性断片のようなCAGA関連認識配列と複合体を形成する能力を有する任意のSmadタンパク質を単独で、又は組換えポリペプチドの一部として、タンパク質要素として使用した本技術分野で公知の様々な手法を利用し得る。このような手法は、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A laboratory Manual 1989に記載されている。特異的な結合性複合体のDNA部分は、認識配列を含有する

CAGAボックスを備えた被験オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを具備し得、これらのオリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得るか、又はゲノム若しくはcDNA断片であり得、又は例えばプラスミド若しくはバクテリオファージに基づく組換えベクターのような組換えベクターの一部であり得る。

【0021】

DNAと本発明のタンパク質との相互作用をスクリーニングする方法は、本技術分野において公知である。このため、既知の量のタンパク質とDNAを混合することができ、複合体形成が起こった後、複合体を形成しなかったDNA又はタンパク質の量を決定することができる。複合体を形成しなかったタンパク質は、一度複合体を分離した後に、例えば、固相酵素免疫検定法（ELISA）による抗体検出、及びローリー、ビウレット、又はブラッドフォードアッセイのような標準的タンパク質測定手法を含む様々な手法によって測定し得る。複合体を形成しなかったDNAはまた、本技術分野で公知の様々な手法、例えば、ビオチン又は放射性標識のような検出可能に標識されたプローブを用いたハイブリダイゼーション（該プローブは、固相化されていてもよく、溶液中にあってもよい）によっても決定し得る。ポリペプチドとDNAの複合体は、それ自身、フットプリンティング、EMSA、シンチレーション近接アッセイ（SPA；scintillation proximity assay）、バイアコア（biacore）、又はバイオチップ／DNAチップ手法を含むそれ自体公知の手法を用いて測定され得る。

【0022】

あるいは、ポリペプチド-DNA複合体の形成又はポリペプチド-DNA複合体の転写能力の程度は、転写に対するその影響によって決定することができる。転写スクリーニングとして公知の方法では、本発明は、最終的にCAGAボックス媒介性の転写制御をもたらす細胞膜から核へのTGF β 又はアクチビン伝達経路を活性化し、又は阻害する化合物をスクリーニングするために使用し得る。このようなアプローチでは、CAGAボックスを含有するオリゴヌクレオチド配列は、レポーターベクター、例えば、検出可能なタンパク質、例えば、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール、アセチルトランスフ

エラーゼ、 β -ガラクトシダーゼを発現するヌクレオチド配列を調節するプロモーター及び／又はエンハンサーに作用可能に連結されたプラスミドのようなベクターにクローニングされ得、このような構築物の中では、このようなレポーター遺伝子の発現レベルは、レポーター構築物の真核細胞中への一過性又は安定トランスフェクション後に、検出することができる。このように、このような転写スクリーニングにおいては、CAGAボックス含有ヌクレオチド配列は、その産物がインビトロシステムで検出できる遺伝子の制御領域内部に組み込まれており、被検物質の存在下（且つTGF β 又はアクチビンの存在下又は不存在下）でインキュベートされた被トランスフェクト細胞中で発現された産物のレベルは、被検物質の不存在下（且つTGF β 又はアクチビンの存在下又は不存在下）でインキュベートされた被トランスフェクト細胞中で発現されたレベルと比較される。

【0023】

好ましくは、本発明の該側面に使用するためのレポーターベクターでは、ポリアデニル化シグナル等のようなプロモーター／エンハンサー領域に加え、翻訳、例えば、停止、開始コドン、及び制御要素のような適切な発現制御配列が提供されるであろう。

【0024】

好ましい側面では、本発明の方法は、繊維症、異常創傷治癒、癌、造血疾患、又は免疫又は炎症性疾患のようなTGF β によって制御される遺伝子の未調節な発現が関与していることが知られている疾病の治療に使用できる可能性のある物質をスクリーニングするために使用し得る。特に、このような物質は、TGF β 又はアクチビンによって媒介されるSmadのDNAへの結合を妨害することによって、又はDNAに結合したSmadの転写能力を妨害することによって、プラスミノゲンアクチベータインヒビター1型の合成を制御し、それ故プラスミンレベルに影響を与えることにより、マトリックスの形成及び／又はフィブリン溶解を調節する。

【0025】

さらなる側面からみると、本発明は、Smadを介したTGF β 又はアクチビン活性化に関連する疾病と闘病するのに適した物質をスクリーニングするための

キットであって、

—上記したSma dタンパク質

—TGF β 又はアクチビン

—上記配列5'WXYCAGACZ3'を含む二本鎖DNA分子であって、必要に応じて、プロモーター配列及びその産物が検出可能である遺伝子のコード領域とに作用可能に連結されている二本鎖DNA分子を備えたキットを提供する。

【0026】

本発明のCAGA関連配列がSma dによるTGF β 又はアクチビンの転写制御に必要であるという認識は、ある種の遺伝子TGF β の制御と関連がある繊維症、異常創傷治癒、造血疾患、又は免疫又は炎症性疾患、及び癌のような疾病の治療への新しい遺伝学的アプローチを与える。

【0027】

このように、さらなる側面からみると、本発明は、一以上のSma dタンパク質及びTGF β 又はアクチビンによる遺伝子制御に関連した疾病を治療する方法であって、上記配列5'WXYCAGACZ3'を含む二本鎖オリゴヌクレオチドを投与することを備えた方法を含む。

【0028】

このような方法では、Sma dタンパク質は、外部から投与されたDNAによって囲い込まれることにより、TGFを介した内因性遺伝子の誘導を妨げる。

【0029】

さらなる側面からみると、本発明は、上記配列5'WXYCAGACZ3'を含む単離された二本鎖DNA分子を提供する。好ましくは、前記配列は、AG(C/A)CAGACAである。本発明は、上記被検オリゴヌクレオチドを含む単離されたDNA分子も提供する。

【0030】

さらに別の側面からみると、本発明は、上記スクリーニングによって同定された任意の物質、及びSma d/TGF β 遺伝子の活性化と関連する疾病と闘病する上でのそれらの使用を提供する。

【0031】

さらに別の側面として、本発明は、転写活性又はTGF β 若しくはアクチビンの遺伝子制御に関与するプロモーター若しくはエンハンサーと一以上のSmadタンパク質との結合を阻害し又は活性化する任意の物質を提供する。前記プロモーターは、ヌクレオチド配列5'WXYCAGACZ3'又はその機能的均等物を含み、前記ヌクレオチド配列では、WはA又はGを表し、XはG又はTを表し、YはC、A、又はGを表し、ZはA又はCを表す。

【0032】

このような物質は、小さな有機分子、タンパク質、又はポリペプチド、又は核酸分子を含む任意の種類の分子であり得る。所望の効果を有するとして同定された物質は、繊維症、創傷治癒、癌、造血、神経保護、免疫又は炎症の適切なモデルでさらにテストしてもよい。

例

転写スクリーニングとして知られている方法では、本発明は、最終的にCAGAボックスを介した転写制御をもたらす細胞膜から核へのTGF β 又はアクチビン伝達経路を活性化し、又は阻害する物質をスクリーニングするために使用され得る。

【0033】

レポーターベクターは、レポーター遺伝子、例えば蛍光のルシフェラーゼを含有するプラスミド中にCAGAボックスを保持した転写領域を、CAGAを含有する該転写領域が、前記レポーター遺伝子の転写を調節するように、クローニングすることによって作成し得る。特に、PAI-1プロモーターは、蛍光のルシフェラーゼ遺伝子の upstream にクローニングすることができる。

【0034】

あるいは、人工的な構築物は合成することができ、該合成では、化学的に作成されたCAGA配列を含有するオリゴヌクレオチドが、蛍光のルシフェラーゼ遺伝子の転写を調節するようなプロモーター又はエンハンサー配置でクローニングされる。このような構築物は、図1に記載されており、図1では、CAGAオリゴヌクレオチドがTK又はMLPプロモーターの upstream にクローニングされている。

このTGF β 誘導性CAGA配列含有レポーターベクターは、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン、リポソーム媒介又は電気穿孔法のような様々な古典的手段により、真核細胞中に、好ましくは哺乳類細胞株、例えばHEpG2細胞株の中にトランスフェクトしなければならない。

【0035】

好ましくは、トランスフェクションは、CAGAボックス含有レポータートランス遺伝子を安定に発現するクローン細胞株を作成する。これは、ネオマイシン又はハイグロマイシンのような薬物に対する耐性遺伝子をコードする耐性プラスミドを共トランスフェクトし、耐性プラスミドを安定に組み込むことによって、表記の薬物に対する耐性を習得した被トランスフェクト細胞を選択することによって取得し得る。

【0036】

好ましくは、安定な細胞株は、例えば、レニーラ (renilla) のルシフェラーゼのような、その発現された産物が測定可能な活性を有している別のトランス遺伝子を安定に組み込んでいる。該トランス遺伝子の発現は、TGF β 又はアクチビンによって制御されるべきでない、すなわち、それは、その制御領域中にCAGA配列を含有すべきではない。たとえば、レニーラルシフェラーゼ遺伝子は、RSV (Rous Sarcoma Virus) プロモーター又はSV (Simian Virus 40) プロモーターから転写され得る。蛍のルシフェラーゼトランス遺伝子の発現を修飾する、すなわちCAGA配列を通じて作用をもたらす薬学的物質をスクリーニングするときには、レニーラルシフェラーゼトランス遺伝子の発現は、特異性の対照としての役割を果たす。これは、CAGAボックスを介した転写を通じて特異的に作用する物質は、蛍のルシフェラーゼ活性に対する効果を有するが、レニーラルシフェラーゼ活性に対する効果は有しないことを意味する。特に、CAGAボックスを介した転写のインヒビターをスクリーニングするときには、レニーラルシフェラーゼ活性は、CAGAボックスを介した転写を特異的に阻害する物質と毒性のある物質とを識別する。

【0037】

アッセイ混合物は、十分な細胞培養用培地中でインキュベートされた被トラン

スフェクト細胞と一又は数種の候補薬学的物質を含む。インヒビターをスクリーニングする場合には、CAGA配列を介した転写を活性化するために、前記細胞培養用培地は、(好ましくは、0.1 ng/mL~50 ng/mL) TGFβ又はアクチビンを含む。アクチベーターをスクリーニングする場合には、TGFβ又はアクチビンの存在は、不可欠ではない。一又は数種の候補薬学的物質が存在する混合物の蛍ルシフェラーゼ活性とこのような候補物質が存在しない混合物の活性との差は、この又はこれらの物質がSmadタンパク質のCAGA配列上への結合によって媒介される転写活性を制御することができることを示す。

【0038】

候補物質は、多くの化学的クラスを包含するが、典型的には、それらは有機化合物であり、好ましくは、多くの場合50~2500の間、より好ましくは約1000未満の分子量を有する小さな有機化合物である。候補物質は、ペプチド、糖、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導体、構造的類縁体、又は組み合わせ等を含む生体分子中にも見出される。候補物質は、ランダムな合成及び誘導された合成、コンビナトリアル化学、及び合成又は天然化合物のライブラリーを含む広範な入手源から取得される。

【0039】

本明細書に記載されている方法は、高情報量 (high-throughput) スクリーニングに特に適している。本プロセスを自動化するために、トランスフェクトされた細胞は、96ウェル又は384ウェルのマイクロプレート中に播種され、培養される。軸回転可能なアームを備えたコンピューター制御された電気機械的なロボットは、テストの様々な工程：細胞の播種、TGFβ又はアクチビンの存在下又は不存在下での培地とのインキュベーション、被検薬学的物質とのインキュベーション、細胞の洗浄、及びルシフェラーゼ活性の表示を実行するようにプログラムされる。ルシフェラーゼ活性は、市販のキット、好ましくは、ロボットに接続され、マイクロプレートを読み取ることができる複インジェクターのルミノメーターを有するキットを用いた古典的な方法によって読み取られる。

【0040】

ここで、以下の非限定的な例を参照しながら本発明を記載する。

実験の方法

プラスミド構築物

pGL3ベーシックプラスミド（プラスミド）を用いて、CAGAレポーターベクターを作成した。TK又はMLPプロモーターをPCR増幅し、BglIIとHindIII部位の間に挿入した。CAGAボックス含有オリゴヌクレオチドをXhoI部位の中にクローニングした。クローニングしたオリゴヌクレオチドの配列は、

CAGAボックス含有オリゴヌクレオチド：

5' TCGAGAGCCAGACAAAAAGCCAGACATTTAGC
CAGACAC 3'

3' CTCGGTCTGTTTTTCGGTCTGTAAATCG
GTCTGTGAGCT 5'

5' TCGAGAGACAGACAAAAAGACAGACATTTAGA
CAGACAC 3'

3' CTCTGTCTGTTTTTCTGTCTGTAAATCT
GTCTGTGAGCT 5'

CAGA変異体オリゴヌクレオチド：

5' TCGAGAGCTACATAAAAAGCTACATATTTAGC
TACATAC 3'

3' CTCGATGTATTTTTTCGATGTATAAATCG
ATGTATGAGCT 5'

pGL3-ベーシックベクター（Promega）のSacI/BglII部位中に、PCR増幅されたヒトPAI-1プロモーターの806+72断片を挿入することによって、PAI-1-Lucベクターを作成した。QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene）を用いて、製造者のプロトコールに従って、ヒトPAI-1プロモーター中の部位特異的変異誘発を行った。GAG及びTIDドメインを含む、又は含有しないSma d2及びSma d3変異体を作成するために、部

位特異的変異誘発 (QuickChange Site-Directed mutagenesis kit, Stratagene) によって、Smad 2とSmad 3をコードしている発現ベクター中にAge I制限部位を挿入した。制限部位の挿入は、短波pク質のアミノ酸配列を修飾しなかった。全ての構築物について、配列をチェックした。同様に、BsmBI制限部位をSmad 3発現ベクター中に挿入した。制限部位の挿入は、タンパク質のアミノ酸配列を修飾しなかった。全ての構築物について配列をチェックした。

細胞培養

ヒトヘパトーマ細胞株Hep G2 (HB 8065)、ヒト乳腺癌細胞株MDA-MB 468 (HTB 132)、及びMv1Luミンク肺上皮細胞株 (CCL 64) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから購入した。Hep G2とMv1Lu細胞は、それぞれ、10%ウシ胎児血清、10mMビルビン酸ナトリウム、100IU/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、及び2mM L-グルタミン (完全培地) を補充したBME又はMEM培地 (Life Technologies, Inc.) 中5%CO₂-95%空気雰囲気下で増殖した。MDA-MB 468細胞は、10%ウシ胎児血清、100IU/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、及び2mM L-グルタミン (完全培地) を有するDMEM/F12 (1:1) 培地 (Life Technologies, Inc.) 中、7.5%CO₂-92.5%空気雰囲気下で増殖した。

トランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ

リン酸カルシウム共沈殿法を用いて、表記の構築物と内部標準pRL-TKベクターとともにHep G2とMDA-MB 468細胞を一過性にトランスフェクトした。次第に増加する量の発現ベクターをトランスフェクトし、pCMV5を添加することによって、総DNAを一定に保った。7ng/mLのヒト組換えTGFB1 (R&D) での刺激の前に、細胞を8時間血清飢餓状態にし、デュアル・ルシフェラーゼ・アッセイ (プロメガ) を用いて、14時間後にルシフェラーゼ活性を定量した。アクチビン及びBMP-7 (Creative Biomolecules) 誘導のために、それぞれ20ng/mLと100ng/mLを

使用した。値は、pRL-TKから発現されたレニーラルシフェラーゼ活性によって標準化した。Mv1Lu細胞は、DEAEデキストラン法を用いてトランスフェクトした。図に示されたルシフェラーゼ値は、少なくとも三回行ったトランスフェクション実験の代表的なものである。

核抽出物

核抽出物は、対照及びTGF β 処理HepG2細胞から調製した。処理から30分後に細胞を採集し、SadowskiとGilmanのプロトコル(SadowskiとGilman, 1993)に従って加工した。簡潔に述べれば、8つの100mm皿からの集密細胞をリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、掻き取った。さらに洗浄した後、2mLの冷たい緩衝液A(20mMHEPES pH7.9、20mM NaF、1mM Na₃VO₄、1mM Na₄P₂O₇、0.13 μ Mオカダ酸、1mM EDTA、1mM EGTA、0.4mMモリブデン酸アンモニウム、1mM DTT、0.5mM PMSF、及び1 μ g/mLの各ロイペプチン、アプロチニン、及びペプスタチン)中に細胞を懸濁した。15分間氷上で細胞を膨張せしめた後、ダウンスの全ガラスホモゲナイザー30ストロークによって、溶解させた。遠心によって核を沈降させ、600 μ Lの冷たい緩衝液C(緩衝液A、420mM NaCl、及び20%グリセロール)中に再懸濁した。ダウンスの全ガラスホモゲナイザー15ストロークによって、核膜を溶解した。得られた懸濁物を4℃で30分間攪拌した。清澄な上清を分取し、-80℃で凍結した。

電気泳動移動度シフトアッセイ

DNAポリメラーゼのクレノウ断片を用いて、[α -³³P]dCTPと[α -³³P]dATPでオリゴヌクレオチドを終末標識した。18 μ Lの結合緩衝液(20mM HEPES pH7.9、30mM KCl、4mM MgCl₂、0.1mM EDTA、0.8mM NaPi、20%グリセロール、4mM スペルミジン、3 μ gポリdI-dC)中において、10 μ gの核抽出物又は400ngのGST-Smadタンパク質、又は16 μ Lのインビトロ翻訳されたSmadタンパク質、及び2ngの標識されたオリゴヌクレオチドを含有する結合反応を37℃で20分間行った。0.5 \times TBEを含有する5%ポリアク

リルアミドゲル中で、タンパク質-DNA複合体を分析した。プローブとして使用した二本鎖オリゴヌクレオチドの配列は、

```

5' TCGAGAGCCAGACAAGGAGCCAGACAAGGAGCC
   AGACAC
      CTCGGTCTGTTCCCTCGGTCTGTTCCCTCGG
TCTGTGAGCTC 5'

```

であった。

【0041】

拮抗物質CAGA変異体オリゴヌクレオチドの配列は、

```

5' TCGAGAGCTACATAAAAAGCTACATATTTAGCT
   ACATAC 3'
3   CTCGATGTATTTTTCGATGTATAAATCGATG
   TATGAGCT 5'

```

であった。

【0042】

他の転写結合部位を含有する拮抗物質オリゴヌクレオチドは、

Fast-1部位:

```

5' TCGAGGCTGCCCTAAAATGTGTATTCCATGGAA
   ATGTCTGCCCTTCTCTC 3'
3'   CCGACGGGATTTTACACATAAGGTACCT
   TTACAGACGGGAAGAGAGAGCT 5'

```

AP-1部位

```

5' CCGGGATGACTCAGC 3'
3'   CTACTGAGTCGGGCC 5'

```

NF-1部位

```

5' CCGGTTTGGATTGAAGCCAATATG 3'
3'   AAACCTAACTTCGGTTATACGGCC 5'

```

Sp1部位

```

5' TCGAGGACAGGGGGCGGAGCCTC 3'

```

3' CCTGTCCCCCGCCTCGGAGAGCT 5'

インビトロ翻訳されたタンパク質を用いて実現されたゲルシフト実験では、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) を用いて、製造者のプロトコールに従って、Sma d タンパク質を生産した。EMSAでの利用前に、SDS-PAGEとオートラジオグラフィーによって [35 S] メチオニン標識したインビトロ合成されたタンパク質を制御した。

Sma d 融合タンパク質の生産及び精製

GSTに融合された完全長Sma d タンパク質とMH2欠失変異体を大腸菌内で発現し、ファルマシアのプロトコールを用いて、カラムクロマトグラフィーによって部分精製した。簡潔に述べれば、2×YTA培地中で細菌を増殖し、0.1 mM IPTGで誘導した。音波処理後、グルタチオン・セファロース4Bを用いてGST融合体を単離し、3回洗浄し、溶出した後、2 mM DTT及び0.5 mM PMSFを補充したPBSに対して透析した。

実験結果

CAGAボックスはTGF β 誘導性DNAエレメントである

我々は、共通の配列モチーフが、ヒトPAI-1プロモーターに沿って同定されたTGF β 応答領域中に存在し得るという可能性を提起した。この問題に答えるために、我々は、短いDNA相同エレメントを探索し、TGF β 転写誘導を媒介することが示された領域中のヒトPAI-1プロモーターの-730位、-580位、及び-280位に、配列AG (C/A) CAGACAが3コピー存在することに気付いた (図1)。我々は、この配列をCAGAボックスと名付け、それがTGF β 誘導性の転写に関与しているかを決定するために、転写レポーターシステム中にそれをクローニングした。チミジンキナーゼ (TK) プロモーターの上流に複数のコピーでクローニングされると、該DNA配列は、ベクターの基礎活性に影響を与えずに、HepG2細胞中にTGF β 媒介性の誘導を与える (図2A)。類似の結果は、Mv1Lu細胞 (図2B) 又はNIH3T3細胞 (データは示していない) で観察された。TATAボックスとアデノウイルスの主要後期プロモーター (MLP) のイニシエーター配列からなる最少プロモーターの上

流に複数のCAGAボックスをクローニングすると、HepG2細胞で数百倍のTGF β 媒介性の誘導倍数が得られた(図2B)。広く使用されているTGF β 応答性p3TP-Luxプラスミドを用いると、この誘導はより低かった。p3TP-Luxは、-730のCAGAボックスを有するPAI-1プロモーターの-740/-636領域を含有することは注目すべきである。特異性の対照として、元の配列と比べて3つの点変異を含有する、突然変異を受けた配列AGCTACATAは、TKプロモーターにTGF β 誘導を与えることはできなかった(図2B)。

ヒトPAI-1プロモーター中のCAGAボックスの突然変異は、TGF β 応答性を消失させる

野生型のヒトPAI-1プロモーターは、三つのCAGAボックスを含有する。TGF β 媒介性の該プロモーターの誘導におけるこれらのボックスの生物学的重要性を探索するために、我々は、TGF β によって誘導されない変異配列を導入することによって、三つのネイティブ配列をそれぞれ変異した(図3)。三つの部位のうちの一つを変異すると、野生型プロモーターに比べて、TGF β の誘導を45%まで減少させた(図3、 $\Delta b1$ 、 $\Delta b2$ 、及び $\Delta b3$ 変異体参照)。二つの部位を変異すると、減少はより大きく(図3、 $\Delta b1 + \Delta b2$ 、 $\Delta b1 + \Delta b3$ 、及び $\Delta b2 + \Delta b3$ 変異体)、三つの部位全てを変異すると、PAI-1プロモーターは、殆どTGF β に応答することができなかった(図3、 $\Delta b1 + \Delta b2 + \Delta b3$ 変異体参照)。TGF β の不存在下では、変異プロモーターと野生型PAI-1プロモーターの転写速度は同様なので、これらのCAGAボックスは、プロモーターの基礎活性を有意に調節しないようである。

CAGAボックスはTGF β とアクチビンに応答するが、BMPには応答しない

特異的なセリン/トレオニンキナーゼI型受容体は、TGF β ファミリーのメンバーの細胞内シグナリングを変換する；BMPR-1A(ALK-3)、BMPR-1B(ALK-6)、及びActR-1(ALK-2)はBMP1型受容体であるのに対して、TGF β とアクチビンシグナルは、それぞれTBR-1(ALK-5)とActR-1B(ALK-4)を介する。TGF β スーパーファミリーのメンバーに対するCAGAボックスの特異性を試験するために、我々は

、TGF β 、アクチビン、及びBMP-7に応答するMv1Lu細胞に、構成的に活性化されたバージョンの1型受容体をコードする発現ベクターをトランスフェクトした。図4Aに示されているように、ALK-4/T206DとALK-5/T204Dの発現は、CAGAボックスレポーターベクターの転写活性化をもたらした。対照的に、ALK-2/Q207D、ALK-3/Q233D、及びALK-6/Q204Dの発現は、全く効果を示さず、CAGA配列は、Mv1Lu細胞中で、TGF β とアクチンによって活性化されるが、BMP誘導シグナリングによっては活性化されないことが実証された。構成的に活性化されたバージョンの1型受容体をトランスフェクションすると、HepG2細胞で同様の結果が得られた（データは示していない）。より生理的な条件を試すために、我々は、アクチビンとBMP-7に応答するHepG2細胞にCAGAボックスレポーターベクターをトランスフェクトし、アクチビン及びBMP-7（OP-1）と共に細胞をインキュベートした。図4Bに示されているように、レポーターを含有するCAGAボックスは、アクチビン及びTGF β の存在下で、それぞれ25及び200倍誘導されたのに対して、BMP-7は、有意な効果を全く示さなかった（2倍の誘導）。このように、CAGAボックスは、アクチビンとTGF β に特異的に応答したが、BMPシグナリングには応答しなかった。

Sma dタンパク質は、CAGAボックスによって媒介されるTGF β 誘導性転写に関与している

Sma dタンパク質が、CAGAボックスを用いたときに観察されるTGF β 誘導性転写活性化に関与しているかどうかを調べるために、我々は、CAGAレポーター構築物とTGF β /Sma d媒介性転写効果を阻害することが知られているSma d7をコードする発現ベクターとをHepG2細胞に同時トランスフェクトした。図5Aに示されているように、Sma d7の過剰発現は、CAGAボックスレポーター構築物のTGF β 誘導性転写を50%阻害する。乳癌由来のMDA-MB468細胞は、内在性のSma d4発現が不足したヒト上皮細胞である。これらの細胞では、TGF β は、CAGAレポーター構築物に対して全く効果を持たない（図5B）。しかしながら、Sma d4をコードする発現ベクターの同時トランスフェクションは、ベクターを含有するCAGAボックスのTG

F β 転写誘導を復活させ、Smad4が該配列によって媒介されるTGF β 転写効果に必要であることを実証している。

Smad3とSmad4は、CAGAボックスに結合する転写因子核複合体に存在する

次の工程で、我々は、TGF β 応答性CAGA配列上のDNA結合活性の特徴を明らかにする目的で、HepG2核抽出物を用いて、電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)を行った。我々は、TGF β によって誘導された細胞からの核抽出物を用いた場合にしか存在しない結合複合体を同定することができた(図6、レーン2と3を比較せよ)。最大の結合には、30分のTGF β 誘導時間が必要であるが、10分の誘導後には複合体を明瞭に観察することができる(データは示していない)。これは、de novoタンパク質合成が必要でなく、既に存在する因子が、迅速且つ翻訳後に修飾され、又は核の中に移転されることを示唆している。過剰なコールドのCAGAオリゴヌクレオチドは、対応するバンドを置き換えるが、変異された過剰のボックスは置き換えないので、このDNA結合複合体は特異的である(図6、レーン4と5)。さらに、この複合体は、これらの転写因子が結合する対応するDNA配列によって置き換えられないので、Sp1、AP-1、NF-1、又はFAST-1のようなTGF β /アクチビンシグナリングの媒介物質と推定される転写因子を含有していない(図6、レーン6~10)。Smadタンパク質がCAGA結合複合体中に存在するかどうかを調べるために、核の抽出物をSmad1~Smad5に対する特異的な抗血清と共にインキュベートした。我々は、抗Smad3及び抗Smad4抗血清とのTGF β 依存性結合複合体の上方シフトを検出することができた(図7、レーン6及び8)。これらの上方シフトは、抗血清を作成するために使用された免疫原性ペプチドの添加によって拮抗されたので、抗体認識の特異性が証明された(図7、レーン7及び9)。抗Smad1、抗Smad2、及び抗Smad5抗血清の添加は効果を有しないので(図7、レーン4、5、及び10)、我々は、CAGAボックスDNA結合核複合体は、TGF β /アクチビンシグナリングSmad3及びSmad4タンパク質を含有するが、Smadタンパク質もBMPシグナリングSmad1及びSmad5タンパク質も含有していないと結論する。これ

は、CAGAレポーター構築物が、Sma d 3を活性化するTGF β 及びアクチビン受容体によって活性化されるが、Sma d 1とSma d 5を介してシグナルを伝達するBMP受容体によっては活性化されないことを示すトランスフェクション実験と合致する（図4 A及び4 B参照）。

Sma d 3とSma d 4はTGF β 誘導性CAGAボックスに直接結合する

我々が前記したゲルシフト実験は、核CAGA配列-結合複合体中にSma d 3とSma d 4が存在することを実証するが、Sma d 3とSma d 4のDNAへの結合が直接か否かについては決定できない。この問題に答えるために、我々は、EMSAにおいて、大腸菌で発現されたGST-Sma d 融合タンパク質を使用した。図8に示されているように、MH2ドメインが欠失したSma d 3とSma d 4は、CAGAボックス含有プローブに直接且つ特異的に結合した。上方シフト実験と合致して、Sma d 1 Δ MH2とSma d 2 Δ MH2タンパク質はDNAに結合できなかった。さらに、ショウジョウバエのMa d タンパク質の例とは反対に、細菌中で産生された完全長のSma d 4タンパク質は、CAGA配列に対して直接且つ特異的なDNA結合活性を有していた（図9）のに対して、完全長のGST-Sma d 1、GST-Sma d 2、およびGST-Sma d 3はDNAに結合できない。

Sma d 2はCAGA媒介性転写を活性化しない

図10に示されているように、CAGAレポーター上でのTGF β の活性化は、Hep G 2細胞中にSma d 3の発現ベクターをトランスフェクトすることによって模倣できる。しかしながら、Sma d 3と全体で92%の同一性を共有するSma d 2タンパク質のトランスフェクションは、CAGA媒介性の転写に影響を与えず、Sma d 2とSma d 3が機能的に均等でないことを示している。

Sma d 3のMH1ドメインは、CAGA配列への特異的なDNA結合に十分である（図8参照）。Sma d 2とSma d 3MH1ドメインとの比較は、主要な差は、Sma d 3にはない2つのアミノ酸のストレッチがSma d 2には存在することであることを明らかにしている（図11）。我々は、Ser²¹とGly³⁰の間に含まれる10残基（概ねグリシンとセリン）を含有する短いN末端のアミノ酸配列をGAGと名付けた。アミノ酸Ser⁷⁹～Thr¹⁰⁸にわたる

30残基長のセリンとトレオニンが豊富な大きい方の配列は、TIDと呼んだ。これらの配列がSma d 2の転写活性の欠損に関与しているかどうかを決定するために、我々は、両配列が欠損したSma d 2タンパク質を作成した(図12)。Hep G 2細胞中にトランスフェクトされた該変異体は、野生型Sma d 3と同等のレベルまでCAGAレポーターを活性化した(図13)。このSma d 2 Δ GAG Δ TID変異体は、GAG又はTIDドメインが、Sma d 2とSma d 3との間に観察された機能的な差異に関与していることを示している。次の工程では、我々は、この転写の差異が単一のドメインに起因し得るかどうかを決定することを試みた。この問題に應えるために、我々は、Sma d 2中のGAG (Sma d 2 Δ GAG) 又はTID (Sma d 2 Δ TID) 配列を欠失させ、CAGAレポーターベクターに対する変異体の影響をテストした。図13に示されているように、Sma d 2 Δ TID変異体は、CAGAレポーターを明瞭に活性化することができ、TIDドメインがSma d 2の転写能の不存在に関与していることが示された。我々は、Sma d 2 Δ GAGを用いた場合には、CAGAレポーターの活性化は全く観察できなかった。しかしながら、我々は、ウェスタンブロットによって、この変異体の発現を検出できなかった(図14、データは示していない)、我々は、この実験から、GAGドメインが転写活性の不存在に関与していないと結論付けることはできなかった。

【0043】

Sma d 2欠失変異体で得られた結果を完全にするために、我々はSma d 3中にGAG又はTIDドメインを導入した。前記データと合致して、TID配列を含有するSma d 3変異体(すなわち、Sma d 3+GAG+TID、及びSma d 3+TID)は、CAGAレポーターを活性化することができず、再度この配列の関与が示された。それらは、ウェスタンブロットアッセイで検出されたので(図14)、これらの転写的に不活性な変異体は細胞内で発現されていたことに注意しなければならない。Sma d 3中に単一のGAGドメインを導入しても、その転写能力は変化しなかった(Sma d 3+GAG、図13参照)。これらの結果は、Sma d 3とSma d 2との間で観察された転写の差異は、単一のTIDドメインに起因し、GAG配列によるものではないことを明確に示してい

る。

エキソン3に対応するTIDドメインはSma d 2がCAGA配列に結合するのを阻害する

Sma d 3とSma d 2との転写活性化能力の差異は、異なるDNA結合能によって説明され得る。実際に、TIDドメインは、Sma d 2とSma d 3との転写の差異に必要なので、該ドメインがSma d 2のDNAへの結合を阻害することは可能である。この仮説を確かめるために、我々は、インビトロ転写／翻訳システムを用いて、Sma d 変異体タンパク質を作成し、それらのDNA結合能をゲルシフトアッセイでテストした。図15に示されているように、完全長の野生型Sma d 3は、Sma d 2とは異なり、CAGAオリゴヌクレチドに結合した。この実験では、Sma d 3はGSTドメインに融合されておらず、このため、GSTドメインが何らかの形でSma d 3のDNA結合能を修飾することを示していることに留意しなければならない（図9参照）。Sma d 3は、3ヌクレオチドが変異されたバージョンのCAGA配列を含有するオリゴヌクレオチドプローブには結合できなかった（図16）、この結合は特異的であった。トランスフェクション実験と合致して、両配列が欠失したSma d 2（Sma d 2 ΔGAG ΔTID）とSma d 2 ΔTIDは、CAGAプローブに結合できたのに対して、Sma d 2 ΔGAGは結合できなかった。先に観察した転写活性と総体的に関連して、Sma d 3+GAGはCAGAオリゴヌクレオチドを結合しなかったが、Sma d 3中へのTIDドメインの導入（すなわち、Sma d 3+TID、及びSma d 3+GAG+TID）はSma d 3のDNAへの結合を妨害しなかった。このように、TID配列は、Sma d 2がCAGAボックスにDNA結合するのを妨害することによって、Sma d 2が転写を活性化するのを阻害する。

【0044】

驚くべきことに、Sma d 2に存在するTID配列は、エキソン3に正確に対応している（Takenoshita et al. Genomics, 1998, 48, 1-11）。さらに、エキソン3にスプライスされたバージョンのSma d 2が、ヒトの胎盤で検出されている（Takenoshita

et al. Genomics, 1998, 48, 1-11)。もしかすると、このスプライシング現象は、制御されているかもしれず、ある種の細胞タイプと条件に特異的であるかもしれない。この短い方の型は、完全長のSmad2とは異なり、TIDドメインを含有していないので、それは、Smad3より同じように転写を活性化し、少なくともある程度はSmad3と、すなわち、結合能とCAGA配列からの転写活性化能が重複している。

CAGA媒介性転写スクリーニングの実例：

CAGA-レポーター細胞クローン

高情報量の転写スクリーニングを行うために、安定に組み込まれたTGF β 応答性CAGAボックス含有レポーターを含有する二つの細胞株を作成した。(CAGA) β MLP-Lucベクター(最少MLPプロモーターの上流にクローニングされた九つのCAGAボックスの制御下にある蛍ルシフェラーゼ；図1に記載されている)とpRc/RenillaベクターをHepG2細胞中に安定に同時トランスフェクトすることによって、第一のクローン細胞株、クローンF89はが得られた。pRc/Renillaベクターは、SV40プロモーターの調節下にあるネオマイシン/ジェネティシン(geneticin)遺伝子耐性とRSV LTRによって駆動されるレニーラルシフェラーゼ遺伝子とを含有する。pRc/Renillaは、ルシフェラーゼレニーラ遺伝子を含むpRL-SV40(Promega)のHindIII/XbaI断片を、pRc/RSVベクター(Invitrogen)のHindIII/XbaI部位の中にクローニングすることによって得られた。第二のクローン細胞株、クローン1613は、野生型ヒトPAI-1-Lucレポーターベクター(ヒトPAI-1プロモーターの制御下にある蛍ルシフェラーゼ、図2に記載されている)とpRc/RenillaプラスミドとをHepG2細胞に安定に同時トランスフェクトすることによって得られた。両ケースにおいて、HepG2細胞は、リン酸カルシウム共沈殿法を用いて安定にトランスフェクトされた。ジェネティシン耐性クローンを単離するために、トランスフェクトされた細胞は、1mg/mLジェネティシン(Gibco)の存在下で増殖させた。続いて、F89と1613クローンを単離し、0.5mg/mLジェネティシンの存在下で増幅し、高情報量のスクリ

ーニングを実行するのに十分な量の細胞を得た。

【0045】

蛍ルシフェラーゼトランス遺伝子の発現を調節する転写制御領域（すなわち、プロモーター）の中にCAGAボックスが存在するために、両クローンは、用量依存的な態様で、TGF β の存在下において、高度に活性化された蛍ルシフェラーゼ活性を示す。レニーラルシフェラーゼの活性は、TGF β の存在下でも殆ど修飾を受けない。このため、レニーラルシフェラーゼ活性は、内部毒性の対照として使用することができる。

【0046】

表2は、次第に増加する量のTGF β の不存在下又は存在下で、クローンF89と1613で観察された相対蛍ルシフェラーゼ活性（誘導倍数）を示している（値1は、TGF β の不存在下で得られた相対蛍ルシフェラーゼ活性に相当する）。

【表2】

TGF β (ng/mL)	0	0.2	0.5	1	5	10
クローン F89	1	6	31	109	461	737
クローン 1613	1	8	nd	26.2	43.5	50.1

【0047】

表3は、次第に増加する量のTGF β の不存在下又は存在下で、クローンF89と1613で観察された相対レニーラルシフェラーゼ活性（誘導倍数）を示している（値1は、TGF β の不存在下で得られた相対レニーラルシフェラーゼ活性に相当する）。

【表3】

TGF β (ng/mL)	0	0.2	0.5	1	5	10
クローン F89	1	1.1	1.1	1.2	1.5	1.8
クローン 1613	1	0.8	nd	1	1	1.3

【0048】

自動化されたロボットによる高情報量の転写スクリーニング

96穴マイクロプレートフォーマットで高情報量のスクリーニングを実施するために、細胞アッセイを自動化した。全プロセスは、平行して動作を行うことができ、周辺装置（すなわち、軸回転可能なアーム、回転式の台、細胞洗浄装置、ピペットステーション（pipette station）、細胞インキュベーター、ルミノメーター・・・）を調節し、プログラムの経時的な進行を最適化するコンピューターシステム（CLARA, Scitec）によって操作される。この高情報量スクリーニングに使用される一般的なスケジュールは以下のとおりである。

【0049】

第1日	→	第2日	→	第3日	→	...
細胞の播種		血清除去		ルシフェラーゼ定量		データ分析
		候補物質のイン				
		キュベーション				
		TGF β 添加				

第1日目には、マルチドロップ装置を用いて、40個の（96穴）マイクロプレートに、血清含有培地200 μ L中ウェル当たり35000細胞の濃度で、CAGA-レポーター細胞（すなわち、F89又は1613）が播種される。これらのプレートは、ロボットライン中に組み込まれた細胞インキュベーター中に置かれる。このインキュベーターは、軸回転可能なアームが侵入して細胞マイクロプレートを取扱い得るようにするドアを有するようにデザインされている。

【0050】

18～24時間後（第2日目）、100%DMSO中に希釈されたテストすべき化学物質を含むマイクロプレートが、回転式の台に置かれ、細胞インキュベーション操作が開始される。続いて、コンピューターシステムは、TGF β の存在下で、テストすべき化合物と共に細胞をインキュベートするために、様々な末端装置の動作を調和させる。

【0051】

細胞と化合物のマイクロプレートは、軸回転可能なアームによって、ロボット

ラインを介して適当な周辺装置に移動される。細胞は洗浄され、無血清培地でインキュベートされる。ピペットステーションは、TGF β とテストすべき化学物質と共に細胞をインキュベートするために、予備的な希釈を含む様々な操作を実現する。テストに使用したTGF β (R&DからのrhTGF β -1)の最終濃度は、1 ng/mLであり、化合物は、1%の最終濃度のDMSO中において、10 μ Mの最終濃度でテストされる。細胞は、TGF β を添加する15~30分前にテストすべき化合物とインキュベートされる。テスト反応の最終容量は、150 μ Lである。ウェルA1~H10は、テストウェルであり、TGF β の存在下でテストすべき化学物質と共にインキュベートされる細胞を含有する。各ウェルは、単一の化学物質のみを含み、CAGA媒介性転写に対するその影響をテストすることを可能とする。カラム11と12は、対照のために留保する。カラム11は、化学物質なしにTGF β 存在下で細胞がインキュベートされる8つのウェルを含有する。カラム11は、インヒビター又はアクチベーター化合物の候補を同定するために、テストウェル中で測定された値と比較されるであろう「参照用TGF β 誘導性のホタルルシフェラーゼ値」を決定する。ウェルA12~D12では、細胞は、TGF β なしの培地中で増殖される。これらの点で得られたホタルルシフェラーゼ値は、「基礎ホタルルシフェラーゼ活性」を表し、TGF β 誘導が正しいことを確認することが可能となる。ウェルE12~H12では、細胞は、TGF β の存在下で、細胞に有毒な化合物である500 μ MのCPO (シクロペンテノン、Sigma)と共にインキュベートされる。毒性は、減少したホタルルシフェラーゼとレニーラルシフェラーゼ活性 (カラム11で得られる活性の約50%)によって表される。これらの点は、テストが毒性化合物に感受性があることを確認することを可能とする。

【0052】

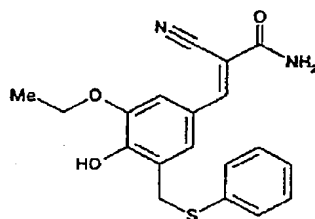
12~18時間後 (第3日目)、ルシフェラーゼ定量操作が開始される。以下の反応は、PromegaのDual Luciferase Assay Kitの試薬を用いて実現される。細胞を洗浄し、10 μ Lの受動溶解緩衝液 (Promega)を添加して溶解される。15~30分攪拌した後、プレートのルシフェラーゼ活性を複インジェクターのルミノメーター (BMG lumist

ar)で読む。このために、50 μ Lのルシフェラーゼアッセイ試薬と50 μ LのStop & Glo緩衝液が順次注入され、両ルシフェラーゼの活性を定量する。続いて、データがプロセッシングされ、適切なソフトウェアを用いて分析される。

CAGA媒介性転写のインヒビターの記載

上述の自動化された高情報量転写スクリーニングで、数千の化学物質がアッセイされた。 α -シアノ-4-ヒドロキシ-3-エトキシ-5-フェニルチオメチルシンナムアミド化合物（以下化合物Aと称する）は、例に示されているように、クローンF89と1613の両クローンのTGF β 誘導性ホタルルシフェラーゼ活性に対して阻害的な効果を有するが（5 μ Mと10 μ Mの間のIC₅₀）、レニーラのルシフェラーゼ活性に対しては阻害的な効果を持たないことが見出された。

【化1】



化合物A（ α -シアノ-4-ヒドロキシ-3-エトキシ-5-フェニルチオメチルシンナムアミド）

【0053】

表4は、1 ng/mLのTGF β 存在下での、クローンF89と1613のホタルルシフェラーゼ活性に対する徐々に増加する濃度の化合物Aの効果を示している（値100は、化合物Aの不存在下且つ1 ng/mL TGF β の存在下で観察されたホタルルシフェラーゼ活性に相当する）。

【表4】

化合物Aの 濃度 (μ M)	0	0.1	1	5	10
F89	100	98	95	86	23
1613	100	105	102	65	36

【0054】

【図面の簡単な説明】

【図1】

CAGAボックスがTGF β 誘導性DNAエレメントであることを示す図。ヒトPAI-1プロモーター中には、黒塗りのバーで図示された2つの領域が、TGF β に応答するように記載されている。該プロモーター中に存在する3つのCAGAボックスの配列が示されている。

【図2】

HepG2細胞は、HSV1-チミジンキナーゼプロモーター (TK) の上流にクローニングされたCAGA配列を9コピー含有する異なるベクターがトランスフェクトされた。AGCCAGACAは、PAI-1プロモーター中の-730位に存在する配列であり、AGACAGACAはPAI-1プロモーターの他の二つのCAGAボックス (-580と-280位) の配列である。最後の構築物は、表記のごとく、三つのpb上に変異を受けたCAGAボックスを含有している。ルシフェラーゼ活性が示されており、TGF β による誘導倍数が表示されている。(図2A)。

HepG2細胞とMv1Lu細胞は、p3TP-Lux、すなわち最少アデノウイルス主要後期プロモーター (MLP; Major Late Promoter) の上流に9又は12コピーのCAGAボックスを含有するベクターをトランスフェクトされた。TGF β による誘導倍数が、HepG2細胞について示されている。Mv1Luをトランスフェクトした細胞について、基礎及びTGF β で誘導されたルシフェラーゼレベルが示されている。

【図3】

ヒトPAI-1プロモーターのCAGAボックスは、TGF β による誘導に必要である。PAI-1プロモーター中のCAGAボックスの変異は、部位特異的

変異誘発によって導入された。野生型のAG (C/A) CAGACA部位は、変異を受けたAG (C/A) TACATA配列によって置換された。変異を受けたボックスは、×印のついた矩形によって表されている。TGF β 不存在下での基礎レベル及びトランスフェクトされたHepG2細胞中にTGF β が存在する場合の誘導倍数が示されている。

【図4】

CAGAボックスが、TGF β とアクチビンシグナルには応答するが、BMP経路には応答しないことを示す図。

Mv1Lu細胞に、(CAGA)₁₂-MLP-Lucレポーター構築物とTGF β 、アクチビン、又はBMPシグナリングに特異的なセリン／トレオニンキナーゼ受容体の構成的に活性化されたバージョンをコードする発現ベクターとを共トランスフェクトした。Alk-2は、ActR-1受容体であり、Alk-3はBMPR-1A受容体、Alk-4はActR-1B受容体、Alk-5はTGF β R-1受容体、Alk-6はBMPR-1B受容体である(図4A)。

HepG2細胞は、(CAGA)₁₂-MLP-Lucレポーター構築物をトランスフェクトされ、BMP-7、アクチビン、又はTGF β によって誘導された(それぞれ、100ng/mL、20ng/mL、及び10ng/mL)。

【図5】

Smadタンパク質が、CAGAボックスによって媒介されるTGF β 誘導性の転写に関与することを示す図。

HepG2細胞に、(CAGA)₉-MLP-Lucレポーター構築物と次第に増加する量(0、10、15、20、30、及び40ng)のSmad7阻害タンパク質をコードする発現ベクターを共トランスフェクトした(図5A)。

MDA-MB468細胞は、(CAGA)₉-MLP-Lucレポーター構築物

と次第に増加する量(0、250、500、750ng)のSmad4タンパク質をコードする発現ベクターをトランスフェクトした。表記されている場合には、500ngのSmad4発現構築物とともに250ngのSmad7発現ベクターを共トランスフェクトした(図5B)。

【図6】

Sma d 3とSma d 4が、TGF β 誘導性CAGAボックスに直接結合することを示す図。

CAGA配列を含有する³³PラベルされたプローブとTGF β によって30分誘導された、又は誘導されなかったHe p G 2細胞からの核抽出物を用いてEMSAを行った。特異的なTGF β に誘導された複合体に相当するバンドが示されている。野生型及び変異を受けたCAGA配列を含む50又は100モル過剰の様々なコールドのオリゴヌクレオチドを拮抗物質として添加した。

【図7】

CAGAプローブと混合する前に、特異的な抗Sma d 抗血清をTGF β によって誘導されたHe p G 2核抽出物とともにインキュベートした。上方にシフトした複合体が示されている。抗Sma d 3と抗Sma d 4抗血清の特異性を示すために、反応性の抗血清を作成するために使用された抗原性ペプチドをレーン7と9に加えた。

【図8】

保存されたカルボキシ末端MH2領域が欠失した大腸菌によって発現されたGST-Sma d 1、2、3、及び4タンパク質を³³PラベルされたCAGAプローブとともにインキュベートした。表記したときには、50モル過剰のコールドオリゴヌクレオチド拮抗物質を加えた。核DNA結合複合体の位置を明らかにするために、レーン2のプローブにTGF β 処理したHe p G 2細胞の核抽出物を添加した。

【図9】

細菌中で産生される、GSTドメインに融合された完全長のSma d タンパク質を使用した類似の実験を示す図。

【図10】

Sma d 3の過剰発現は、レポーターベクターのTGF β の活性化を模倣するのに対して、Sma d 2の過剰発現は模倣しない。He p G 2細胞は、(CAGA)₉MLP-Lucレポーターベクターで一過性にトランスフェクトした。Sma d 発現ベクターを共トランスフェクトした細胞は、表記のごとく、血清飢餓

状態にしたが、TGF β で処理しなかった。

【図11】

転写不活性に不可欠なSmad2ドメインのマッピングを示す図。

Smad2とSmad3のヒトタンパク質配列を示す図。黒のボックスは、二つのタンパク質の配列間の差を包含する。MH1とMH2ドメインは、それぞれ直線と破線が下に付されている。GAGとTIDドメインも示されている。

【図12】

Smad2とSmad3ドメインをスワップしたキメラを示す図。

【図13】

HepG2細胞中でのSmad2とSmad3変異体による(CAGA) μ MLP-Lucレポーターベクターの誘導を示す図。細胞には、等しい濃度の表記の変異体構築物とともに(CAGA) μ MLPレポーターベクターをトランスフェクトし、TGF β の不存在下でルシフェラーゼ活性をアッセイした。

【図14】

Smad2又はSmad3変異体を発現するHepG2細胞抽出物のウェスタンブロット分析を示す図。トランスフェクションの後、デュアルルシフェラーゼアッセイキット(Promega)を用いて準備した溶解用緩衝液によって細胞を溶解し、8.5%SDS-PAGE上でタンパク質を分離し、続いて、抗Smad2/Smad3ポリクローナル抗体(sc-6032, Santa Cruz)を用いてブロッティングした。等しいタンパク質の賦与を評価するために、溶解物には、抗 β アクチンポリクローナル抗体(sc-1615, Santa Cruz)を用いてイムノブロッティングも行った。ウマのペルオキシダーゼに結合された二次抗体を用いた化学発光によって、一次抗体を現出せしめた。

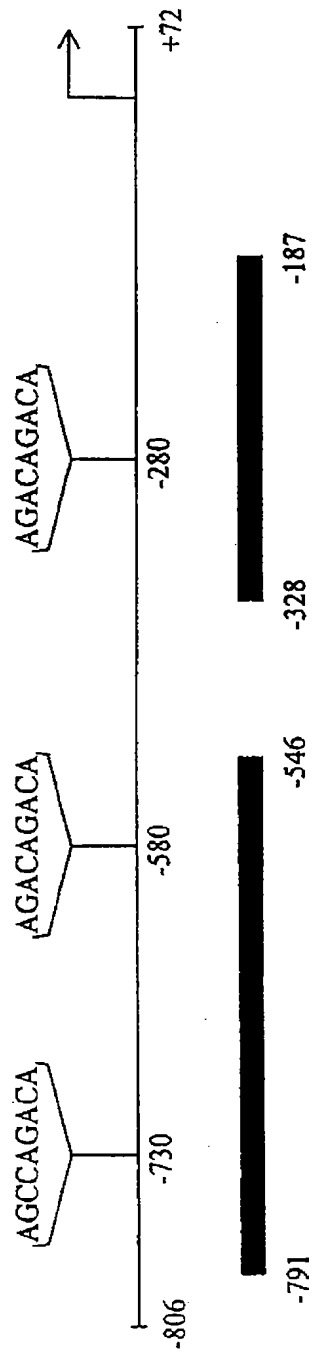
【図15】

TIDドメインがSmad2のCAGA配列への結合を阻害することを示す図。インビトロで翻訳されたSmad2とSmad3変異体(上図)のSDS-PAGE分析とCAGAオリゴヌクレオチド上での、インビトロ翻訳されたこれらのタンパク質を用いたゲルシフトアッセイ(下図)。

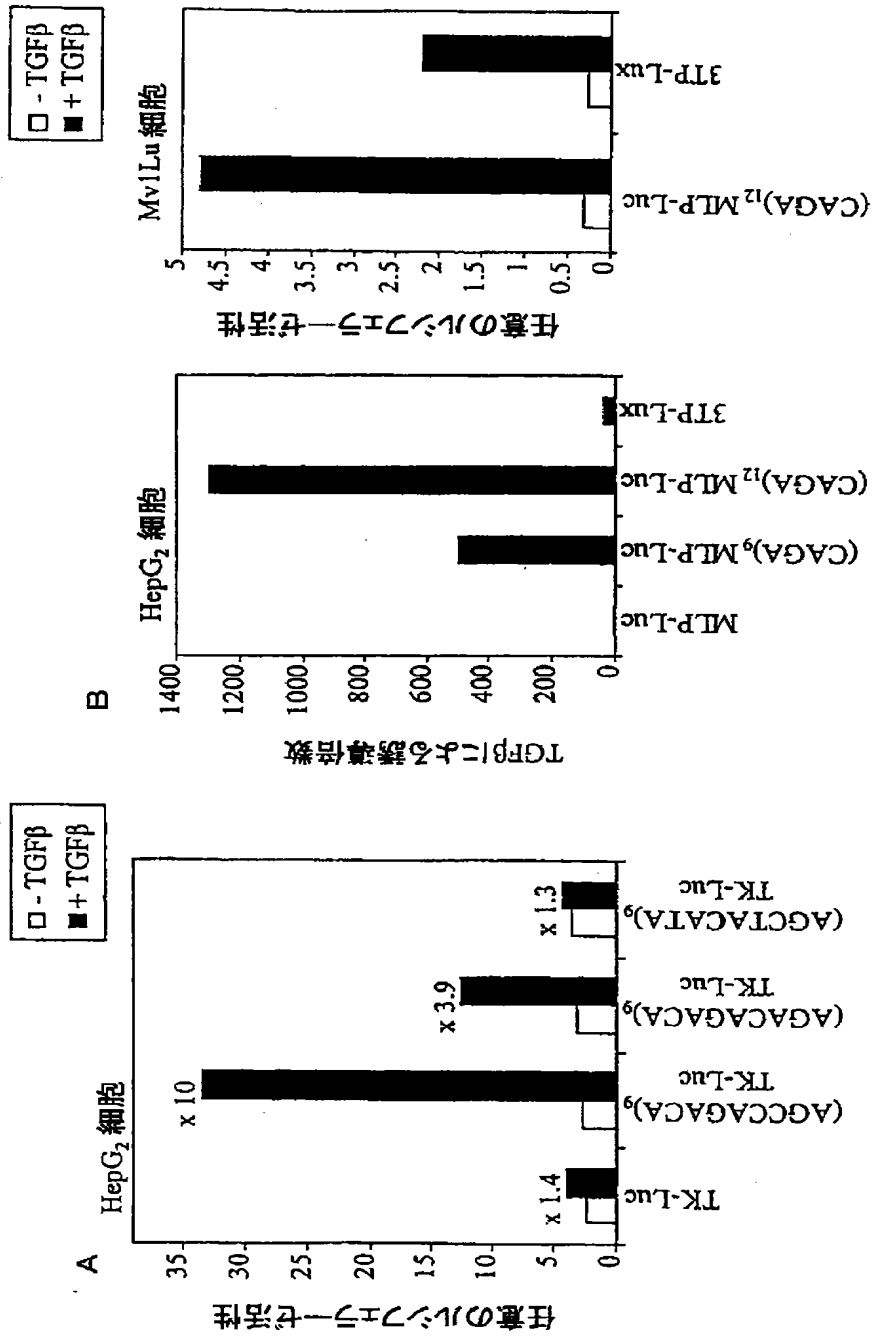
【図16】

変異を受けたCAGAプロンプ上でのSma d変異体を用いたゲルシフトアッセイを示す図。

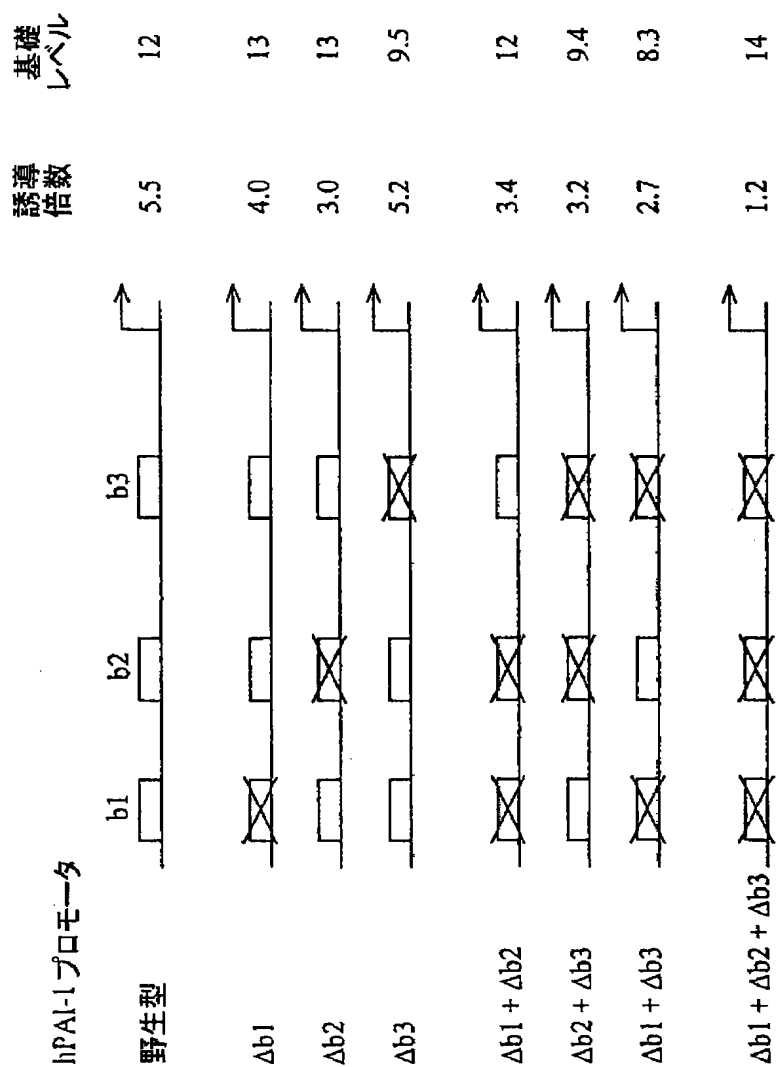
【図1】



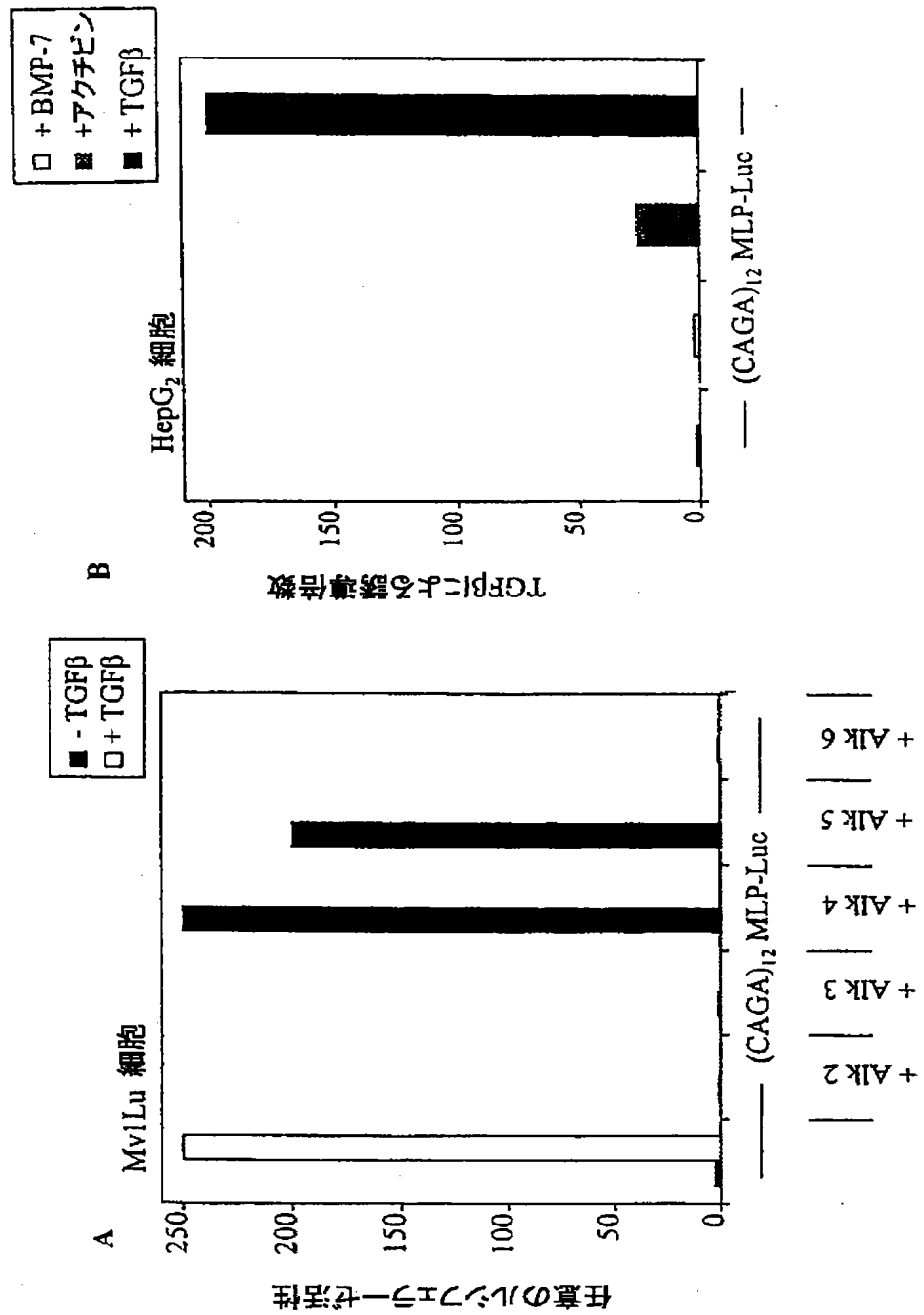
【図2】



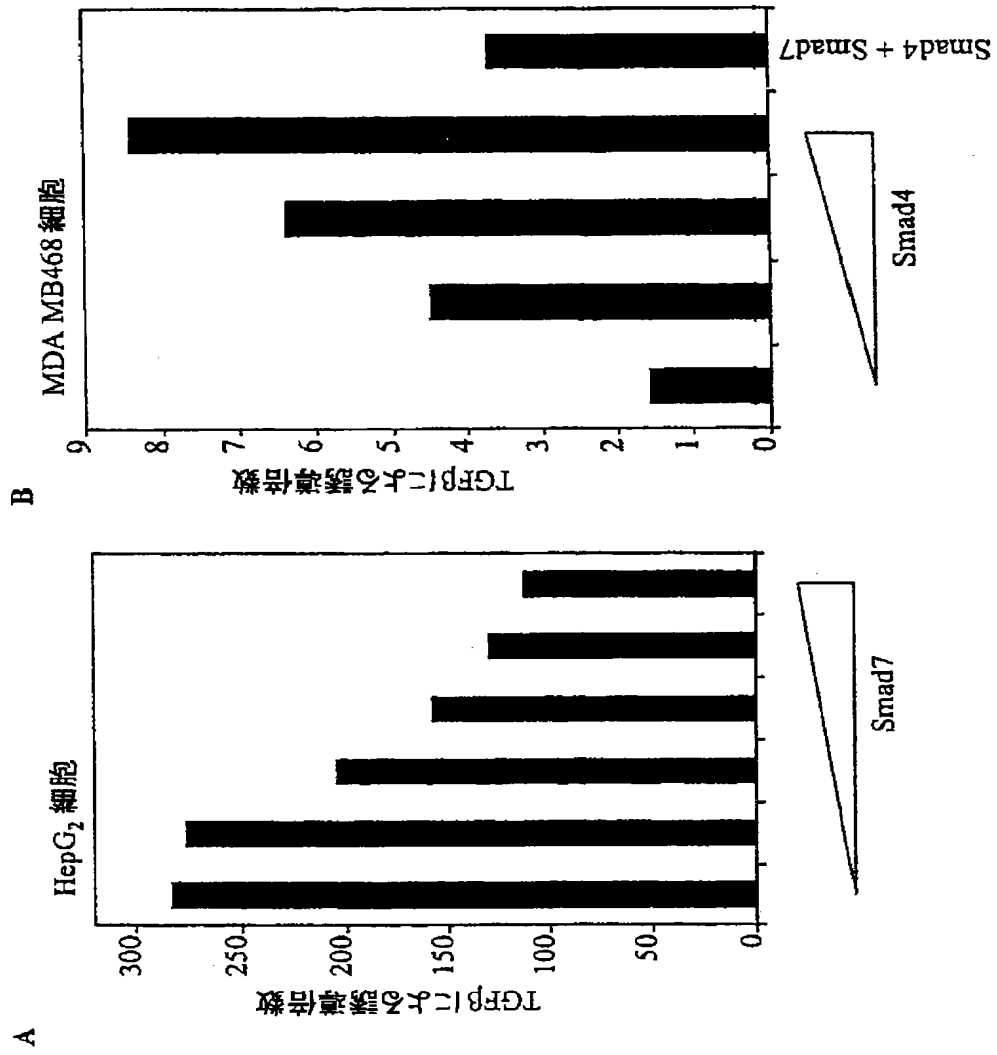
【図3】



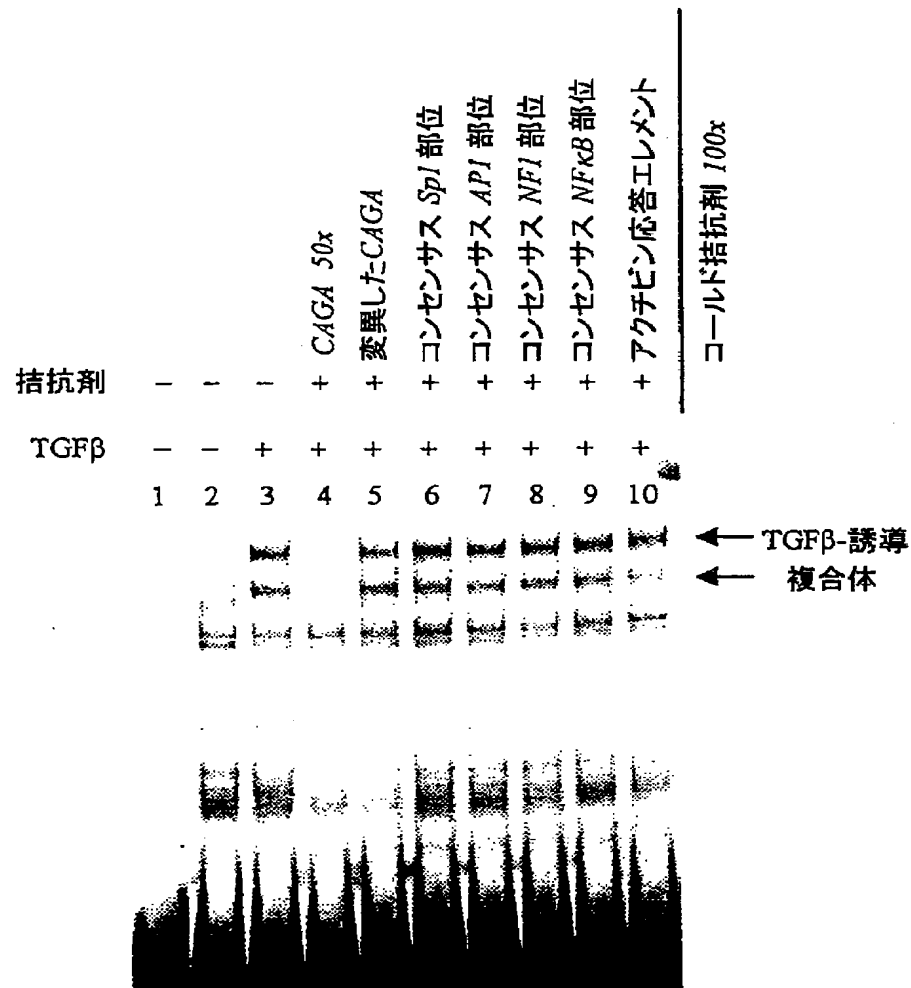
【図4】



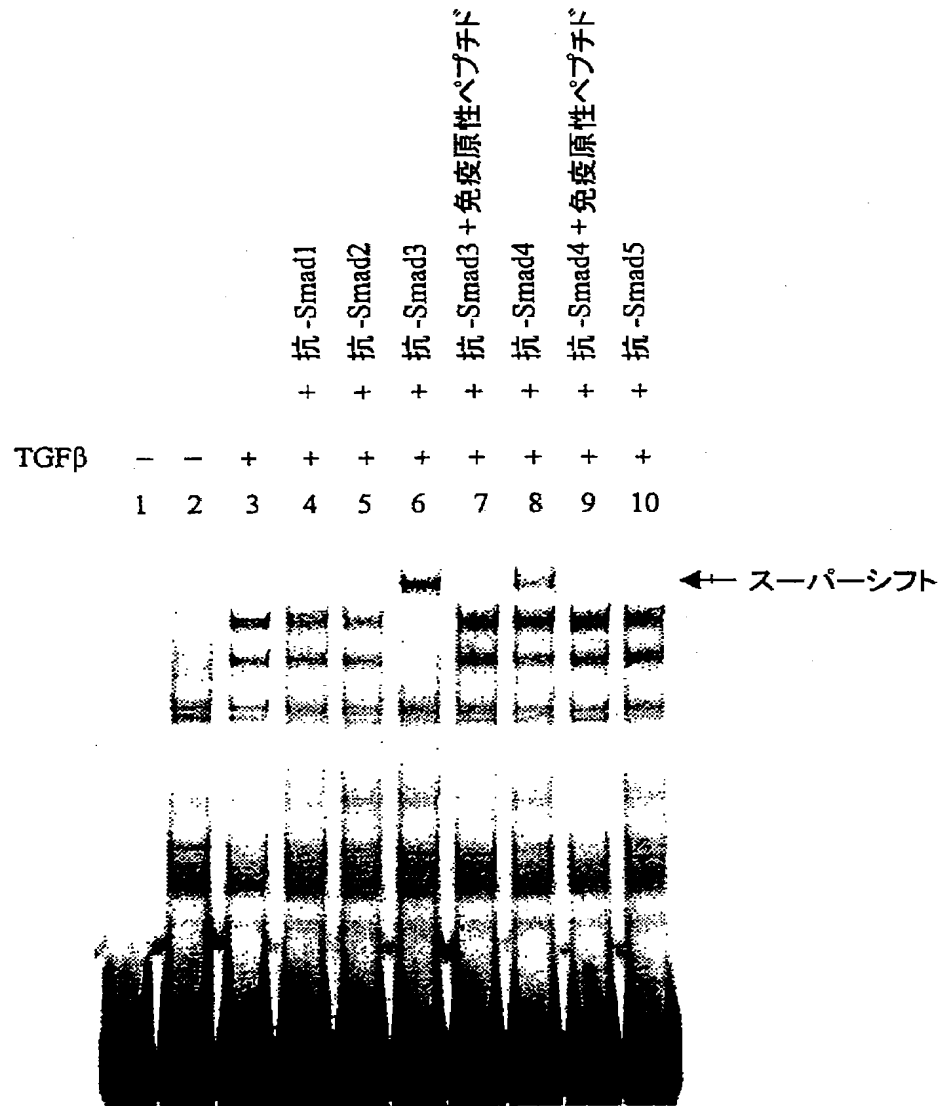
【図 5】



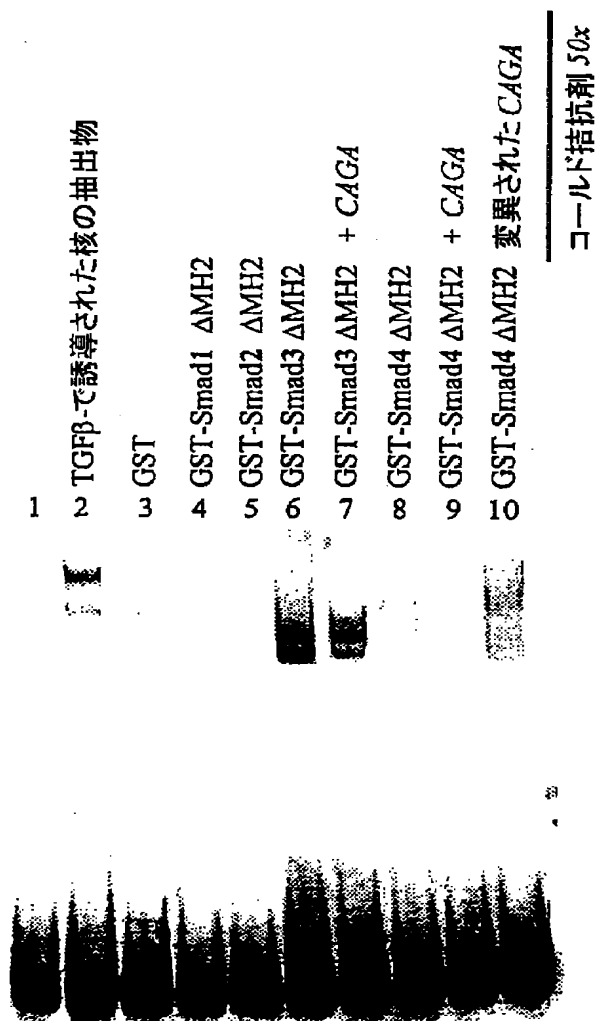
【図6】



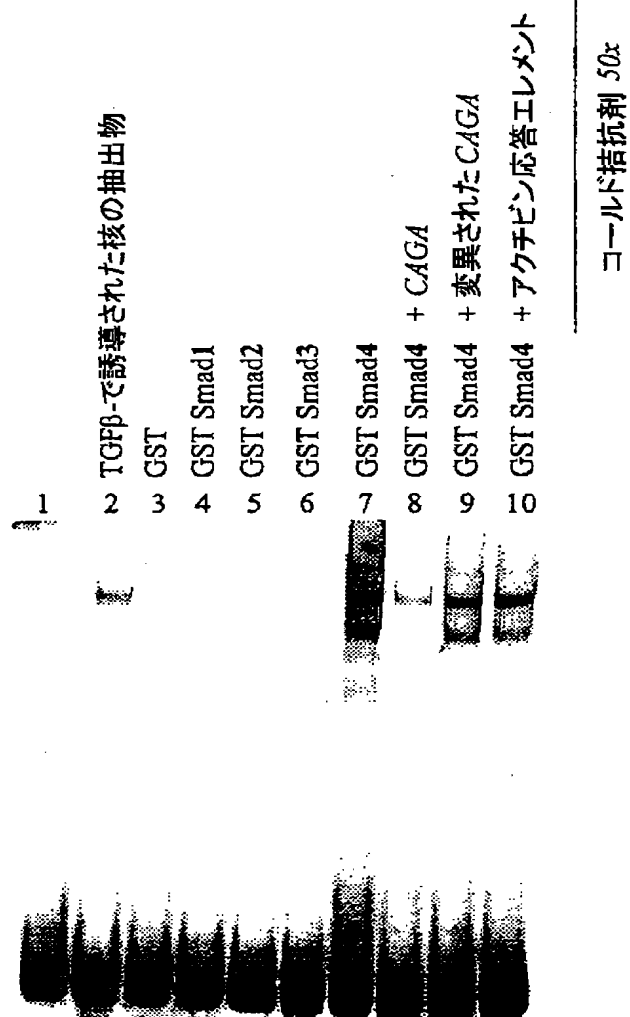
【図7】



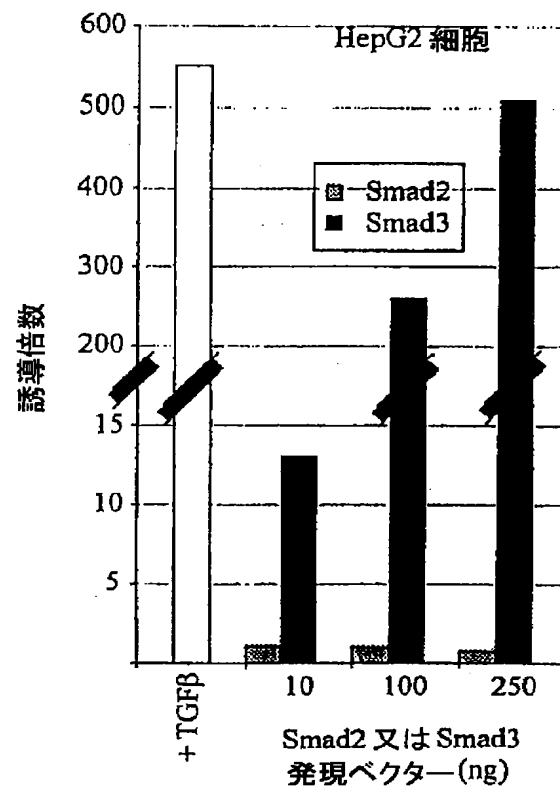
【図8】



【図9】



【図10】



GAG

MSSILPFTPPIVKRLGWKK

TID

NTKCITIP

HELPRAMEL

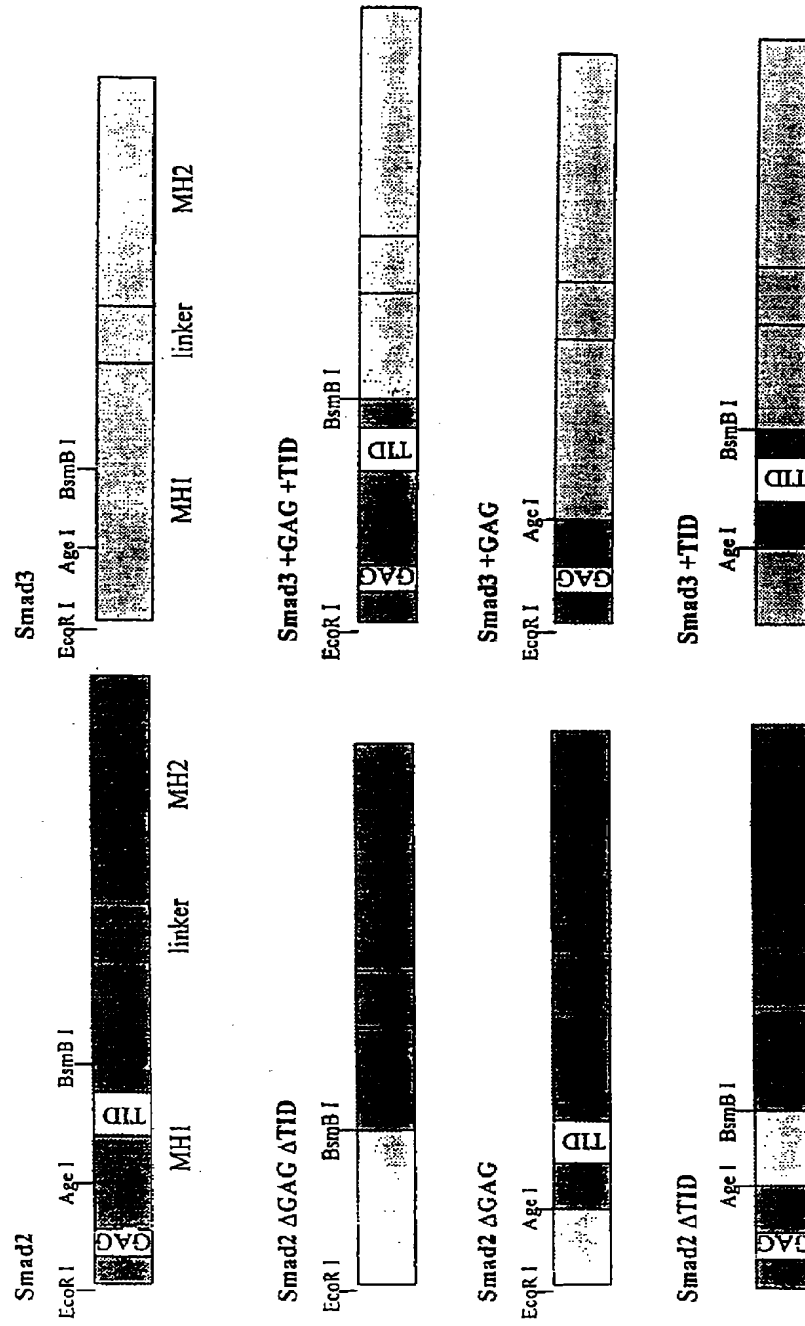
EPQSN-IP

ELNQRVGE

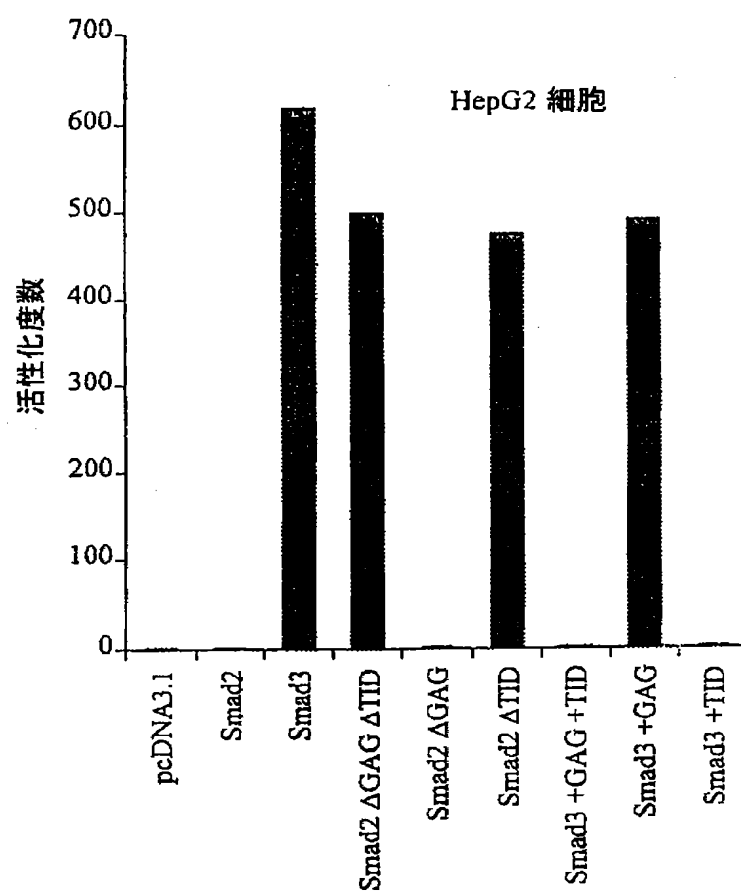
SDSAIEVQ:

GWGAEYRR

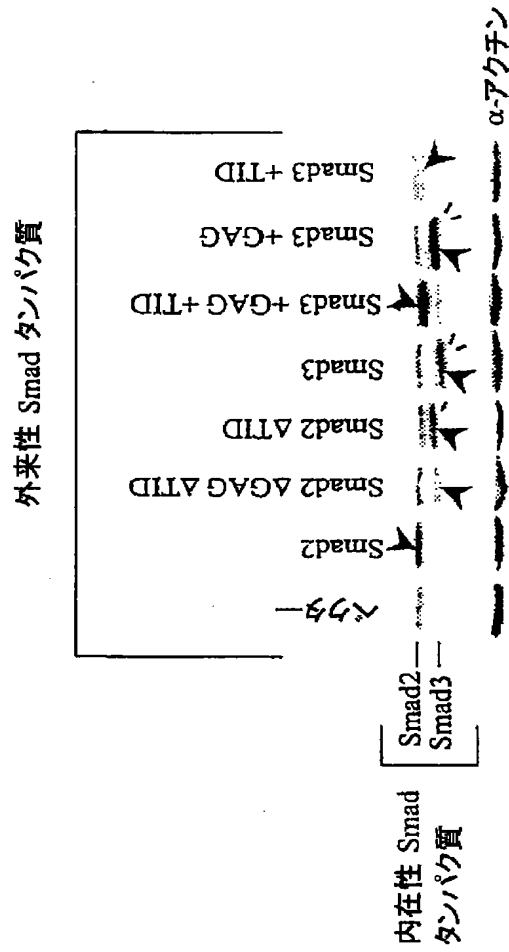
【図12】



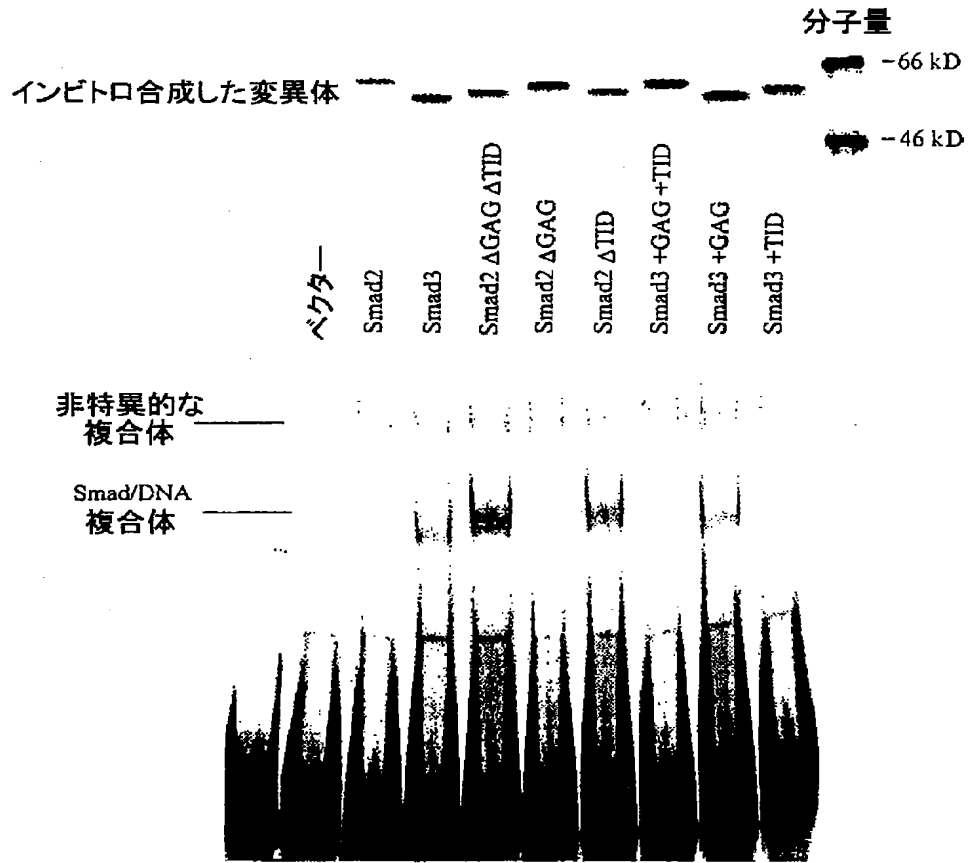
【図 13】



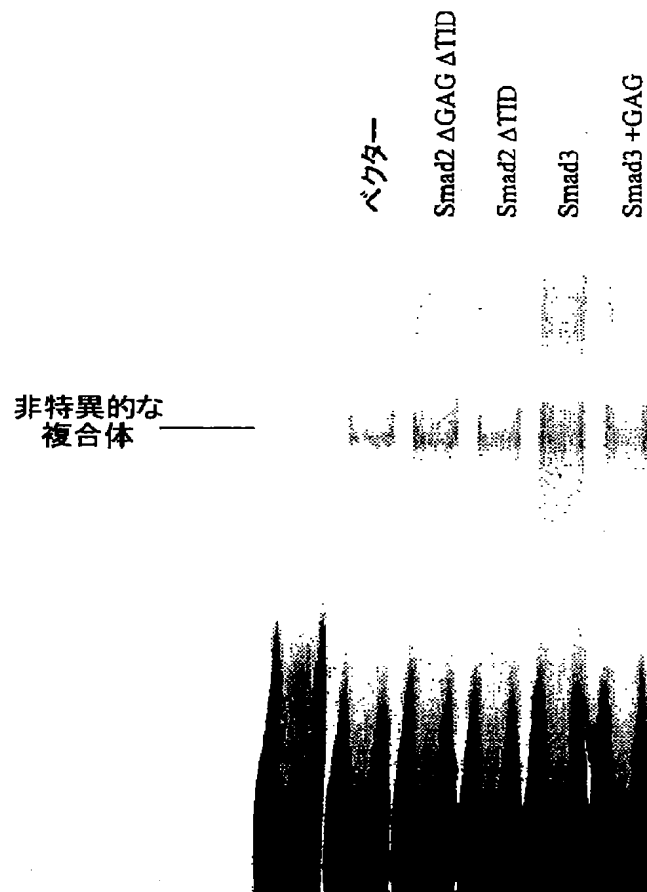
【図 14】



【図15】



【図16】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 99/00664	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12Q1/68 C12Q1/02 GOIN33/50 A61K31/70 C12N15/11 //C12N5/10	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q A61K C12N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
	Relevant to claim No.
X	YINGLING ET AL.: "Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 17, no. 12, December 1997 (1997-12), pages 7019-7028, XP002106769 cited in the application the whole document
X	HELDIN ET AL.: "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins" NATURE, vol. 390, 4 December 1997 (1997-12-04), pages 465-471, XP002110963 cited in the application the whole document
	1-3,5,6, 10-16, 20,21
	20,21
-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 August 1999	17/08/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5816 Patentplan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Reuter, U

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 99/00664

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages.	Relevant to claim No.
X	KEETON ET AL.: "Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 34, 5 December 1991 (1991-12-05), pages 23048-23052, XP002110964 the whole document	6,16
X	DE CAESTECKER M P ET AL: "Characterization of functional domains within Smad4/DPC4" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 21, 23 May 1997 (1997-05-23), pages 13690-13696, XP002084021 ISSN: 0021-9258 the whole document	6,16
A	WO 89 02472 A (AMRAD CORP LTD) 23 March 1989 (1989-03-23) abstract; claims	1-21
P,X	DENNLER S ET AL: "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene." EMBO JOURNAL, (1998 JUN 1) 17 (11) 3091-100, XP002110965 the whole document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/00664

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim(s) 7, 8, 10, 11, 13 and 14
is(are) directed to a method of treatment of the human/animal
body, the search has been carried out and based on the alleged
effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such
an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is
restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 99/00664

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8902472 A	23-03-1989	AU 2524888 A	17-04-1989
		EP 0391911 A	17-10-1990
		JP 3502040 T	16-05-1991

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 P 25/00		A 6 1 P 35/00	
	35/00	37/00	
	37/00	C 1 2 Q 1/68	
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW		
(71) 出願人	Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue Greenford, Middlesex UB6 0NN, Great Britain		
(72) 発明者	ユエ、ステファーン フランス国、エフ ー 91940 アブニ ユ・ドゥ・ケベック 25、ゼッド・アー・ ドゥ・クールタブフ、サントル・ドゥ・ル シュルシュ、ラボラトワール・グラクソ・ ウエルカム内		
(72) 発明者	ダンレ、シルビアーヌ・ガブリエール・ナ ディース オランダ国、1066 シーエックス、アムス テルダム、プレスマンラーン 121、ディ ビジョン・オブ・セルラー・バイオケミ ストリー、ザ・ネーデルランズ・キャン サー・インスティテュート内		
F ターム (参考)	4B024 AA11 AA12 BA08 BA80 CA04 DA06 EA04 FA01 GA11 HA12 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ20 QQ22 QR77 QR80 QS05 QS24 QX02 4C084 AA17 NA14 ZA012 ZA512 ZA892 ZA962 ZB262		